

Untersuchung zur Resorbierbarkeit von Verbundmaterialien auf der Basis von biodegradierbaren Metallen und Calcium-Phosphat-Zement:

Eine experimentelle Studie am Schaf

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Birzer, Anja** geb. Neuendorf
aus Eisenach

Gießen (2018)

Aus dem Labor für Experimentelle Unfallchirurgie
der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
der Fachbereiche Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. C. Heiß

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Katrin Lips

2. Gutachter: Prof. Dr. Wöstmann

Tag der Disputation: 21.11.2018

Widmung

An Mike Beutler, der viel zu früh aus meinem Leben geschieden ist.
Ebenso an meine Eltern, Großeltern und an meinen Mann, die immer für mich da sind
und mich auf meinem Lebensweg unterstützen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Allgemeines	1
1.2	Aufbau von Knochengewebe.....	2
1.2.1	Makroskopischer Aufbau.....	2
1.2.2	Osteoblasten.....	4
1.2.3	Osteozyten.....	5
1.2.4	Osteoklasten	6
1.3	Knochendefektheilung.....	9
1.4	Fremdkörperreaktion.....	10
1.5	Knochenersatzmaterialien	10
1.5.1	Allgemein	10
1.5.2	Calcium-Phosphat.....	12
1.5.3	Eisenfestkörper	13
1.5.4	Magnesium-Calcium-Phosphat	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit	14
2	MATERIAL und METHODEN	16
2.1	Versuchstiere	16
2.2	Materialien	17
2.2.1	Fertigpaste in Spritze	17
2.2.2	Eisenschäum ohne Zement.....	17
2.2.3	Eisenschäum mit Calcium-Phosphat-Zement (Eisenschäum-CPC).....	18
2.2.4	2P-CPC-Aspirat.....	18
2.2.5	Magnesium-CPC.....	19
2.3	Implantation der Osteosynthesematerialien.....	21
2.3.1	Narkose.....	21
2.3.2	Operation	21
2.3.3	Postoperative Versorgung.....	25
2.4	Euthanasie	25
2.5	Molekularbiologische Untersuchung.....	26
2.5.1	Lagerung der Scheiben	26
2.5.2	RNA Isolierung	26
2.5.3	cDNA Synthese.....	28
2.5.4	Real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Real-time RT-PCR)	28
2.5.5	Etablierung der Primer	29

2.5.6	Real-time RT-PCR für die Zieltargets	29
2.5.7	Statistische Auswertung	32
2.5.8	Graphische Darstellung	32
2.6	Makroskopische Untersuchung	32
2.7	Histologische Untersuchung	33
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Lage der Implantate	36
3.2	Pasten Calcium-Phosphat-Zement (1P-CPC).....	36
3.2.1	Ein Monat.....	37
3.2.2	Drei Monate	37
3.2.3	Sechs Monate	37
3.2.4	18 Monate	38
3.2.5	Mikroskopische Beurteilung.....	40
3.3	Eisenschaum ohne Zement.....	42
3.3.1	Ein Monat.....	42
3.3.2	Drei Monate	42
3.3.3	Sechs Monate	42
3.3.4	18 Monate	43
3.3.5	Mikroskopische Beurteilung.....	45
3.4	Eisenschaum-CPC	47
3.4.1	Ein Monat.....	47
3.4.2	Drei Monate	47
3.4.3	Sechs Monate	47
3.4.4	18 Monate	47
3.4.5	Mikroskopische Beurteilung.....	50
3.5	2P-CPC-Aspirat.....	52
3.5.1	Ein Monat.....	52
3.5.2	Drei Monate	52
3.5.3	Sechs Monate	52
3.5.4	18 Monate	53
3.5.5	Mikroskopische Beurteilung.....	55
3.6	Mg-CPC	57
3.6.1	Ein Monat.....	57
3.6.2	Drei Monate	57
3.6.3	Sechs Monate	57
3.6.4	18 Monate	58
3.6.5	Mikroskopische Beurteilung.....	60
3.7	Molekularbiologie	62
3.7.1	1P-CPC.....	63

3.7.2	Eisenschaum ohne Zement.....	63
3.7.3	Eisenschaum-CPC.....	64
3.7.4	2P-CPC-Aspirat.....	64
4	DISKUSSION	66
4.1	Methode	67
4.1.1	Tiermodell	67
4.1.2	Untersuchungsmethoden	68
4.2	1P-CPC.....	69
4.3	Eisenschaum ohne Zement.....	71
4.4	Eisenschaum-CPC.....	74
4.5	2P-CPC-Aspirat.....	75
4.6	Mg-CPC	78
5	AUSBLICK	81
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	83
7	SUMMERY.....	85
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	87
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	89
10	LITERATURVERZEICHNIS	92
11	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	103
12	ERKLÄRUNG	104
13	DANKSAGUNG	105

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeines

Die Hauptrolle der Knochen ist es als strukturelle Stütze für den Körper zu dienen. Weitere Aufgaben sind unter anderem die Speicherung von Mineralien, der Schutz der inneren Organe und einen Angriffspunkt für die Muskulatur zu bieten, damit diese wirken kann (Sommerfeldt, et al., 2001).

Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko eine Fraktur zu erleiden. Vor allem Frauen sind davon betroffen. Durch den Anstieg des durchschnittlichen Lebensalters der Menschheit steigt auch das Lebenszeitrisko eine Fraktur zu erleiden (Looker, et al., 1997).

Aber nicht nur Frakturen allein stellen ein Problem dar, sondern auch zusätzlich auftretende Knochendefekte, welche operativ mitversorgt werden müssen. Als Knochendefekte ist hierbei der Verlust von Knochensubstanz gemeint. Durch das Fehlen von Knochensubstanz kann der Knochen in seiner Ursprungsform nicht wieder rekonstruiert werden (Huber, 2006). Hierbei müssen auch sogenannte kritische Defektgrößen beachtet werden. Als kritische Defektgröße wird ein Knochendefekt bezeichnet, welcher in seiner Größe zu groß ist, um durch Knochenremodeling aufgefüllt zu werden. Diese Defekte werden an Stelle von neuem Knochengewebe mit Bindegewebe gefüllt (Leunig, et al., 2000). Um dies zu verhindern, muss in kritische Defekte Knochenersatzmaterial eingefügt werden (Großardt, et al., 2010). Millionen Menschen erleiden jährlich einen Knochendefekt in Folge von Traumen, Knochenkrankungen oder Tumoren (Huber, 2006).

Dies stellt die Unfallchirurgie und Orthopädie vor neue Herausforderungen. Neue Knochenersatzmaterialien werden benötigt, welche Frakturen und Knochendefekte therapieren bzw. die Einheilung von starren Implantaten fördern. Diese neuartigen Materialien sollten aber gleichzeitig auch kostengünstig sein. Außerdem sollten die Knochenersatzmaterialien durch den Körper abgebaut werden bzw. in neuen Knochen umgebaut werden (Rueger, 1995).

Da die Entnahme von körpereigenem Material entfällt, können die OP-Zeiten verkürzt werden. Es gibt heute schon vielseitige Anwendungsgebiete für Knochenersatzmaterialien, nicht nur in der Unfallchirurgie. Auch in der Zahnmedizin und in der Neurochirurgie finden sie ihre Anwendung.

1.2 Aufbau von Knochengewebe

1.2.1 Makroskopischer Aufbau

Der menschliche Körper besteht aus etwa 213 Knochen (Clarke, 2008). Diese weisen eine besondere Härte (Druckfestigkeit), aber auch gleichermaßen eine mäßige Elastizität auf. Ein hoher Gehalt an Calcium-Phosphat Kristallen – in der Modifikation Hydroxylapatit – trägt wesentlich zur Härte des Knochens bei. Hydroxylapatit liegt als Nanokristall im Knochen vor (Thorwarth, et al., 2005).

Durch ein ausgeklügeltes System von Kollagenfibrillen, die trajektoriell orientiert sind, wird die Elastizität und Zugfestigkeit des Knochens gewährleistet (Benninghoff, et al., 2008).

Die Funktion des Knochens ist zum einen die Stützfunktion, welche sich durch eine große Druck-, Zug-, Biege- und Verdrehungsfestigkeit auszeichnet und zum anderen die Schutzfunktion für die inneren Organe und das Gehirn. Außerdem spielt der Knochen durch seinen hohen Calciumgehalt eine wichtige Rolle als Calciumreservoir im Mineralstoffwechsel. Die Blutbildung findet ab dem Zeitpunkt der Geburt ebenfalls vorwiegend im Knochen statt (Aumüller, et al., 2006).

Der Knochen ist aus 50-70% anorganischen Mineralien, hauptsächlich Hydroxylapatit, 20-40% organische Substanzen, 5-10% aus Wasser und weniger als 3% aus Fett aufgebaut (Aumüller, et al., 2006; Sommerfeldt, et al., 2001) (siehe Abbildung 1).

Der Knochen unterliegt einem ständigen Längen- und Dickenwachstum, Auf- und Abbau (biologische Plastizität) (Aumüller, et al., 2006; Sommerfeldt, et al., 2001). Diese Prozesse werden durch physiologische und mechanische Einflüsse auf das Knochenskelett bestimmt, aber auch infolge der Reparatur bei Frakturen (Aumüller, et al., 2006; Clarke, 2008).

Dabei wird zwischen dem Lamellen- und dem Geflechtknochen unterschieden, wobei im adulten Organismus Lamellenknochen mit 80% überwiegen (Eriksen, et al., 1994).

Der Geflechtknochen ist die primäre Knochenform, aus der sich der Lamellenknochen über Umbauprozesse entwickelt. Physiologisch bedingt treten Geflechtknochen beim Erwachsenen nur im knöchernen Labyrinth des Innenohrs, der Alveolarwand von Ober- und Unterkiefer und im Bereich der Schädelnähte auf sowie im Rahmen der Knochenheilung nach einem Bruch (Aumüller, et al., 2006).

Die Lamellenknochen besitzen eine sperrholzartige Schichtung von verkalkter Knochenmatrix (Benninghoff, et al., 2008). Die Kollagenfasern sind dabei parallel ausgerichtet. Dadurch ist der Lamellenknochen stabiler als der Geflechtknochen, wohingegen der Geflechtknochen aufgrund seines höheren Wassergehaltes biege- und zugfester ist (Aumüller, et al., 2006).

Die Röhrenknochen gliedern sich in Diaphyse und in distale- und proximale Epiphyse, wobei die Epiphyse an den Enden eines Röhrenknochens zu finden ist. Die Metaphyse enthält die Epiphysenfuge und liegt an beiden Enden zwischen Diaphyse und Epiphyse und verbindet diese. Im Bereich der Epiphysenfuge findet das Längenwachstum bis zum Abschluss der Knochenreife statt. Die einzelnen Epiphysenfugen verschließen sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb der Knochenentwicklung. Die Diaphyse, auch als Knochenschaft bezeichnet, besteht aus der Substantia compacta. Die Markhöhle (Cavum medullare) befindet sich im Inneren der Diaphyse. Die Meta- und Epiphysen werden aus der Substantia spongiosa, einem dichten Gerüst von Knochenbälkchen, dessen Zwischenräume mit blutbildendem Knochenmark gefüllt sind, und der Substantia corticalis gebildet (Aumüller, et al., 2006).

Die Knochenhaut – das Periost – bedeckt den ganzen Knochen. Ausnahmen stellen Gelenkflächen, welche mit Knorpel überzogen sind, und Anheftungsstellen von Sehnen, Bändern und Muskeln dar. Auch an Knochenbereichen, an denen die Synovialmembran auftritt, z.B. am Femurhals, fehlt das Periost. Das Periost ist aus zwei Schichten aufgebaut: Dem Stratum osteogenicum, welches zellreich ist und osteogene und chondrogene Vorläuferzellen enthält, und der äußeren Schicht, dem Stratum fibrosum, das aus kollagenem Bindegewebe besteht, welches straff und geflechtartig ist. Die Kortikalis und das Periost sind über SHARPEYsche Fasern miteinander verknüpft, wodurch eine feste Verbindung zwischen beiden Schichten entsteht (Benninghoff, et al., 2008).

Die wichtigsten Zellen des Knochens sind Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten.

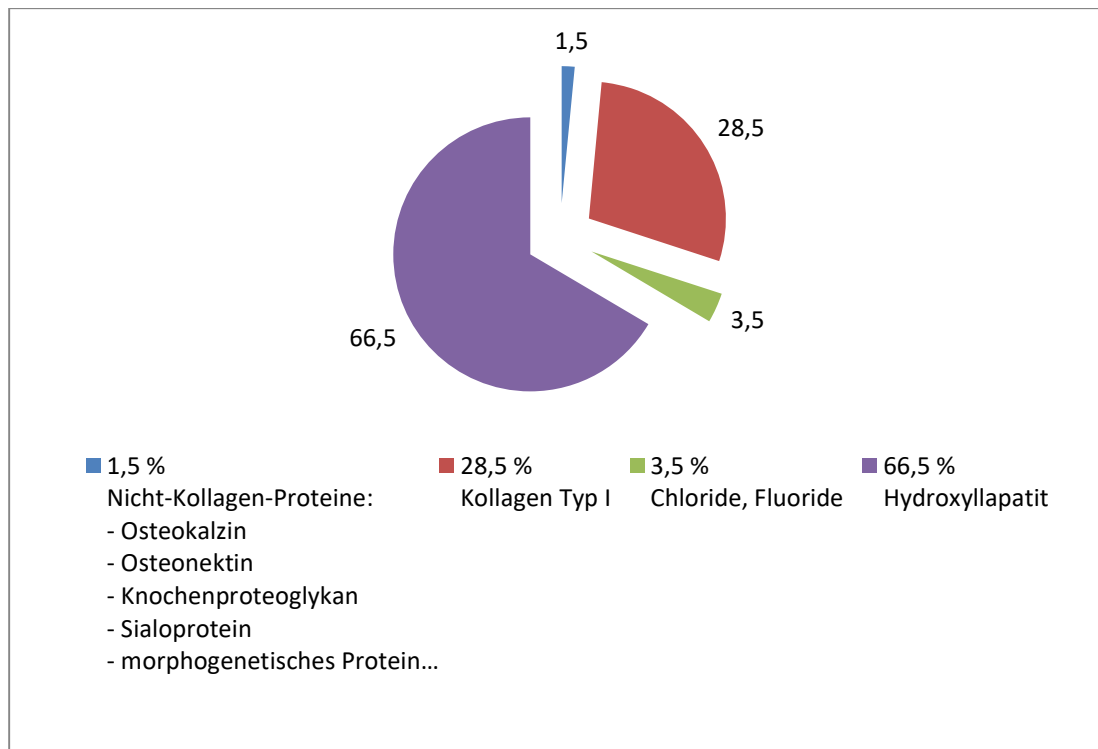


Abbildung 1: Zusammensetzung des Knochens modifiziert nach (Felsenberg, 2001)

1.2.2 Osteoblasten

Osteoblasten sind Zellen, die für das Knochenwachstum, die Mineralisierung und das Remodelling zuständig sind. Durch die Bildung von Osteoid wird das Knochenwachstum bewerkstelligt (Ducy, et al., 2000). Ein Osteoblast bildet ca. 0,5-1,5 µm Osteoid pro Tag und seine Lebensdauer beträgt in etwa bis zu 8 Wochen (Owen, 1972). Osteoblasten zeichnen sich dadurch aus, dass sie einkernig sind und annähernd ein kubisches, plumpes Aussehen besitzen (Benninghoff, et al., 2008). Sie entstehen aus multipotenten Progenitorzellen (Aumüller, et al., 2006).

An der Knochenoberfläche lagern sich die Osteoblasten zu einem dichten Verbund zusammen. Dieser Verbund wird durch Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte sowie eine Vielzahl von Transportmembranproteinen gefestigt. Zu den Transportmembranproteinen gehören Integrine, Connexine und Cadherine. Damit dieser Zellverband auf metabolische und mechanische Reize reagieren kann, sind spezifische Rezeptoren notwendig (Sommerfeldt, et al., 2001).

Die Gap junctions gehören zu einer dieser Rezeptorenarten. Diese Kanäle dienen benachbarten Zellen zur Kommunikation untereinander. Die Gap junctions ermöglichen auch die Kommunikation bzw. den Informationsaustausch zwischen der Zelle und der extrazellulären Umgebung (Gu, et al., 2015). Durch diese Kanäle können Ionen, Inositol-trisphosphate (IP3), Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren zwischen den Zellen ausgetauscht werden (Gu, et al., 2015; Masaki, et al., 2016; Sommerfeldt, et al.,

2001). Osteoblasten betreiben einen hohen Proteinumsatz. Dafür benötigen sie viel raues endoplasmatisches Retikulum (ER) und Golgi-Apparat-Felder, wodurch sie basophil werden (Benninghoff, et al., 2008).

Osteoblasten produzieren den organischen, kollagenen Anteil der Knochenmatrix (Rueger, 1995). Diese besteht aus Typ-I-Kollagen, Proteoglykanen, Osteocalcin, Osteopontin sowie weiteren Proteinen und Wachstumsfaktoren (Unger, et al., 2009).

Osteocalcin hat eine wichtige Signalfunktion während des Mineralisierungsprozesses (Sommerfeldt, et al., 2001). Es ist ein nicht-kollagenes, Vitamin K-abhängiges Protein, welches im späten Stadium der Osteoblasten-Differenzierung sezerniert wird (Neve, et al., 2013). Die Osteoklasten- und auch die Osteoblastenaktivität werden durch Osteocalcin beeinflusst, insbesondere aber die Osteoblasten. Somit hat Osteocalcin einen Einfluss auf die Knochenmineralisierung und auf die Umbauvorgänge am Knochen (Neve, et al., 2013; Stein, et al., 1993). Darüber hinaus wird vermutet, dass Osteocalcin auch an Blutgefäßen eine Reaktion in Form von Induktion der Angiogenese auslöst (Neve, et al., 2013). Osteocalcin wird als spezifischer Marker für Osteoblasten verwendet (Carpenter, et al., 1998; Neve, et al., 2013).

Kollagen 1 α 1 ist die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix von Osteoblasten. Das gebildete Kollagen wird im Osteoid zu Kollagenfibrillen umgelagert und stellt damit das wichtigste Strukturprotein beim Knochenaufbau dar (Lumetti, et al., 2016; Shi, et al., 1996).

1.2.3 Osteozyten

Osteozyten sind Osteoblasten, welche hochspezialisiert und vollständig differenziert sind (Sommerfeldt, et al., 2001). Sie entstehen, indem Osteoblasten in den mineralisierten Knochen eingebaut werden (Felsenberg, 2001). Man kann Osteozyten auch als langlebige, von Osteoblasten-abgeleitete Zellen verstehen (Charles, et al., 2014). Die am häufigsten vorkommenden Zellen im Knochen sind die Osteozyten, obwohl sich nur 20% der Osteoblasten in Osteozyten umwandeln (Aumüller, et al., 2006; Felsenberg, 2001; Sommerfeldt, et al., 2001). Im Vergleich zu Osteoblasten sind Osteozyten kleiner. Dieser Zustand wird dadurch bedingt, dass sie weniger Zellorganellen enthalten. Zu den Zellbestandteilen zählen Ribosomen und das endoplasmatische Retikulum. Auch der Golgi-Apparat ist kleiner ausgebildet. Jedoch haben Osteozyten ein höheres Kern-Zytoplasma-Verhältnis als Osteoblasten (Benninghoff, et al., 2008; Sommerfeldt, et al., 2001).

Die Zell-Zell-Kommunikation erfolgt bei Osteozyten auch über Gap-junctions. Osteozyten besitzen deutlich mehr dendritische Ausläufer mit Gap-junctions als

Osteoblasten. Gap junctions werden durch sechs Connexin-43-Moleküle (Cx43 oder auch bekannt als GJA1) zwischen den Zellen gebildet (Gu, et al., 2015; Plotkin, et al., 2015).

Cx43 ist der häufigste Vertreter der Proteingruppe Connexin im Knochen (Plotkin, 2011). Vor allem wird Cx43 in Osteoblasten und Osteozyten gebildet und stellt damit auch ein Differenzierungsmerkmal für diese dar (Plotkin, et al., 2015). Cx43 ist wichtig für die spätere Differenzierung der Osteoblasten und auch der Osteoklasten (Gu, et al., 2015; Masaki, et al., 2016).

Wird die Bildung von Cx43 im Körper gehemmt, treten Knochenmineralisationsstörungen und eine verminderte Knochenbildung auf. Damit verbunden ist eine geringere mechanische Belastungsfähigkeit des Knochens (Gu, et al., 2015; Masaki, et al., 2016).

Durch Cx43, welches die Gap-junctions bildet, werden unter anderem der Umbau und das Überleben von Osteozyten gesteuert und somit das Knochenwachstum (Gu, et al., 2015). Die Osteozyten sind durch zahlreiche Plasmaausläufer mit Gap-junctions untereinander verbunden. Dadurch entsteht ein Netzwerk aus Osteozyten, die untereinander kommunizieren können und damit eine wichtige Steuerungsstelle für den Knochen darstellen (Felsenberg, 2001).

1.2.4 Osteoklasten

Ihre Aufgabe ist die Demineralisierung und der Abbau von Knochenmatrix (Kim, et al., 2016). Dieser findet in sogenannten Howship-Lakunen und im Zytoplasma der Osteoklasten statt (Sommerfeldt, et al., 2001). Dadurch nehmen sie wichtige Funktionen für die Umbauvorgänge und die Calciumfreisetzung im Knochen wahr.

Osteoklasten stammen aus mononukleären Vorläuferzellen des Knochenmarks, welche im Blut zirkulieren und haben damit eine hämatopoetische Abstammung (Clarke, 2008; Sommerfeldt, et al., 2001). Somit gehören sie zum mononukleären Phagozytensystem (van Furth, et al., 1972).

Hauptmerkmal der Osteoklasten sind die zahlreichen lysosomalen Enzyme, pleomorphen Mitochondrien und Vakuolen. Diese Strukturen werden für den Knochenabbau benötigt. Eine weitere Besonderheit der Osteoklasten ist ihre Fähigkeit, an der apikalen Membran und an der verkalkten Matrix des Knochens eine feste Abdichtung, eine sogenannte Versiegelungszone (sealing zone), zu bilden. Dadurch erfolgt die Anheftung an den zu resorbierenden Knochen. Gebildet wird diese durch Integrine (Podosomen). Durch diese Abdichtung ist der Resorptionsprozess am Knochen durch lytische Enzyme möglich (Aumüller, et al., 2006; Sommerfeldt, et al., 2001).

Howship-Lakunen sind napfförmige Vertiefungen, welche beim Knochenabbau in der Spongiosa und in der Kortikalis entstehen. Sie setzen sich aus drei Zellzonen zusammen: Der osteoklastären Erosionszone, die der Einleitung der Erosion dient. Der monozytären Umkehrzone, welche für den Abbau der entkalkten Matrix durch Makrophagen-ähnliche Zellen zuständig ist und der osteoblastären Verschlusszone. In dieser werden die Lakunen und Tunnel wieder durch Knochenlamellenauflagerungen verschlossen (Benninghoff, et al., 2008).

Die Osteoklasten-Differenzierung und -Aktivierung wird durch zwei wesentliche Zytokine kontrolliert: Zum einen der Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) mit seinem dazugehörigen Rezeptor c-Fms. Zum anderen der Rezeptoraktivator des nukleären Faktor κ B-Liganden (RANKL) mit dem RANK Rezeptor. M-CSF spielt eine wichtige Rolle bei der Unterstützung der Proliferation und dem Überleben von Osteoklasten-Vorläuferzellen. Die Bindung von M-CSF an seinen Rezeptor c-Fms führt zur Auto- und Transphosphorylierung von spezifischen Tyrosinresten an der zytoplasmatischen Domäne vom c-Fms Rezeptor. Der RANKL mit seinem RANK Rezeptor ist wichtig für die Differenzierung von Osteoklasten (Kim, et al., 2016). RANKL als Zytokin gehört zur TNF Superfamilie und wird durch Osteoblastenzelllinien sezerniert. Neuere Studien zeigen, dass es auch einen autonomen Osteoklasten Regulierungskreislauf ohne Osteoblasten zu geben scheint. Der entscheidende Rezeptor ist hierbei LGR4. Dieser stoppt intern die Osteoklastendifferenzierung. LGR4 dient somit als Feedback-Inhibitor für den RANKL-Signalweg (Zaidi, et al., 2016). Ein weiterer Inhibitor ist Osteoprotegerin (OPG). Dieses bindet an RANKL und inhibiert diesen (Kim, et al., 2016).

Ein aktiver Osteoklast weist als Merkmal einen Bürstensaum (ruffled border) auf. Durch diesen wird die Oberfläche um das 10-fache vergrößert und ermöglicht damit einen höheren Umbau des Knochens. Dieser Bürstensaum weist eine charakteristische Zusammensetzung, bestehend aus zahlreichen Ionenpumpen, auf (Felsenberg, 2001). Dabei sind ATP-abhängige Protonenpumpen und die Carboanhydrase (CA) sowie Chloridkanäle und Chlorid-Bicarbonat-Austauscher an der basolateralen Membran wichtig. Durch die Carboanhydrase werden im Zytoplasma des Osteoklasten Protonen und Bicarbonat aus Kohlendioxid und Wasser gewonnen. Die Protonen werden über die H^+ -ATPase in die Howship-Lakunen abgegeben und die Cl^- -Ionen folgen den H^+ Ionen über einen spannungsgesteuerten Cl^- -Kanal. Die Cl^- -Ionen gelangen über den Chlorid-Bicarbonat-Austauscher in die Osteoklasten (Soysa, et al., 2016). Somit entsteht in den Howship-Lakunen eine verdünnte Salzsäure mit einem niedrigem pH-Wert von 4,5 (Sommerfeldt, et al., 2001). Dieser Mechanismus wird durch das lysosomale Enzym Kathepsin K ausgelöst (Felsenberg, 2001) (siehe Abbildung 2).

Osteoklasten bauen ca. zehn Mal so viel Knochensubstanz ab, wie ein Osteoblast bilden kann. Um eine ausgeglichene Bilanz von Auf- und Abbau zu gewährleisten, müssen deshalb mehr Osteoblasten vorhanden sein (Aumüller, et al., 2006).

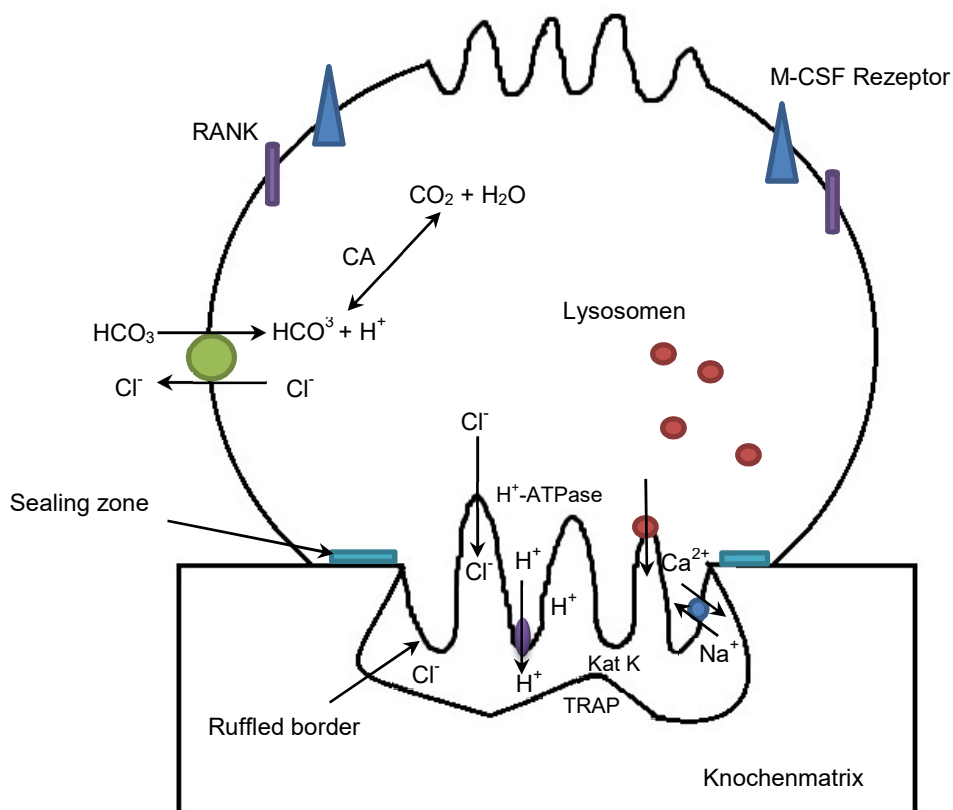


Abbildung 2: Osteoklast mit ruffled border modifiziert nach (Soysa, et al., 2016)

1.3 Knochendefektheilung

Aus osteogenen und chondrogenen Mesenchymverdichtungen entsteht entwicklungsgeschichtlich Knochengewebe, wobei diese Verdichtungen entweder direkt verknöchern, (membranöse oder desmale Ossifikation) oder zuerst in Knorpelgewebe (indirekte oder chondrale Ossifikation) und erst später in Knochengewebe umgewandelt werden (enchondrale Ossifikation). Die direkte Verknöcherung wird auch als primäre Frakturheilung bezeichnet. Sie findet statt, wenn die Knochenfragmente nach einer Fraktur direkt aufeinander stehen. Dies wird bei der Plattenosteosynthese als Heilungsmechanismus benutzt. Als sekundäre Knochenheilung wird auch die enchondrale Ossifikation bezeichnet. Dabei wird vor der Entstehung von neuem Lamellenknochen der Umweg über das sogenannte Kallusgewebe gegangen. Dieser Heilungsmechanismus läuft bei einer Frakturversorgung im Gips oder bei einer intramedullären Nagelversorgung ebenfalls ab. Dabei müssen die Fraktarenden nicht bündig aufeinander stehen. Die sekundäre Frakturheilung dauert länger an als die primäre. Sie ist aber im Ergebnis genauso gut (Benninghoff, et al., 2008; Sommerfeldt, et al., 2001).

Nach einer Fraktur bzw. einem Knochendefekt bildet sich zunächst ein Hämatom durch die Zerstörung von Blutgefäßen im Knochen. Dadurch werden Neutrophile in den zerstörten Blutgefäßen aktiviert. Diese wiederum rekrutieren Makrophagen, welche die toten Neutrophile abbauen. Dadurch beginnt die Reparaturkaskade mit einer Invasion von neuen Blutgefäßen. Diese ermöglichen abermals das Einwandern von osteochondralen Vorläuferzellen, die sich zu Osteoblasten (bei der primären Frakturheilung) oder Chondrozyten (bei der sekundären Frakturheilung) differenzieren können. Das Gebilde aus Chondrozyten und Bindegewebe bezeichnet man als Kallus (Ellinghaus, et al., 2011). Die Differenzierung ist abhängig von der Stabilität und der Blutversorgung im Frakturbereich sowie von der Stellung der Knochenfragmente. Zum Abschluss wird der zunächst entstandene Geflechtknochen bei der sekundären Frakturheilung über Umbauprozesse durch Osteoklasten und Osteoblasten zu lamellärem Knochen umgesetzt (Aumüller, et al., 2006; Benninghoff, et al., 2008; Hu, et al., 2016).

Eine weitere wichtige Funktion des Knochens ist das Remodeling. Es ersetzt zum einen beschädigtes oder totes Gewebe und ist zum anderen notwendig, um den Knochen an Veränderungen bei Belastung, Ernährung- und/ oder metabolischen Veränderungen anzupassen. Beim Remodeling ist der Auf- und Abbau des Knochens über die Aktivierung und Inaktivierung von Osteoblasten und Osteoklasten gesteuert (Sommerfeldt, et al., 2001).

Es ist bis heute nicht abschließend geklärt, welche Mechanismen im Körper für den Knochen Auf- und Abbau ablaufen. Dafür sind noch weitere Forschungen notwendig, um auch Knochenerkrankungen wie Osteoporose und Frakturen noch effektiver therapieren zu können.

1.4 Fremdkörperreaktion

Als lokale Reaktion auf die Implantation von Knochenersatzmaterialien läuft die sogenannte Fremdkörperreaktion im Körper ab. Dies ist ein normaler Mechanismus des Körpers auf Fremdkörper. Als Reaktion auf das Fremdmaterial werden Makrophagen und multinukleare Riesenzellen aktiviert. Diese lagern sich an der Implantatoberfläche an und induzieren eine Fibroblasten-Proliferation, Angiogenese und Kollagenbildung am Interface (Anderson, 1988). Als Interface wird der Bereich zwischen dem Implantat und dem neu gebildeten Knochengewebe bezeichnet.

Der Prozess der Fremdkörperreaktion ist ein sinnvoller Schutzmechanismus des Körpers, im Sinne der Gewebeheilung. Durch diesen Prozess gelangen inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren in erheblichem Ausmaß an die Implantatstelle. Ausgeschüttet werden diese Stoffe durch Makrophagen (Sunderkötter, et al., 1994). Kommt es zum chronischen Verlauf der Entzündungsreaktion nach Implantation eines Fremdmaterialies, kann diese eine Implantatinstabilität eine mangelnde knöcherne Integration oder fibröse Abkapselung des Implantats bedeuten (Tang, et al., 1995).

1.5 Knochenersatzmaterialien

1.5.1 Allgemein

Zur Knochenreparatur werden jährlich ca. 2,2 Millionen Knochentransplantationen weltweit durchgeführt (Hannink, et al., 2011). Dabei muss zwischen autologen, allogenen und synthetischen Knochenersatzmaterialien unterschieden werden.

Der aktuelle Goldstandard bei den Knochenersatzstoffen bei Knochendefekten ist der autologe (körpereigene) Knochen. Dieser wird häufig aus dem empfängereigenen Beckenkamm gewonnen. Autologe Knochenersatzmaterialien zeichnen sich durch eine gute osteokonduktive, osteoinduktive Eigenschaft und eine gute Vermittlung zwischen den Knochenzellen aus. Es stellt damit alle drei wichtigen Säulen der Knochenheilung dar (Bloemers, et al., 2002; Thorwarth, et al., 2005).

Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass ein zweiter Eingriff benötigt wird. Dieser ist oft mit Schmerzen und somit erhöhtem Schmerzmittelbedarf für die Patienten verbunden.

Zusätzlich kommen noch die allgemeinen Operationsrisiken wie Narben, Deformationen und Instabilität in den Bereichen, aus dem die Spongiosa entnommen wird, hinzu. Außerdem verlängert sich die Operationszeit und das Infektionsrisiko steigt an (Rueger, 1995). Autologer Knochen steht nur begrenzt zur Verfügung (Bloemers, et al., 2002) und ist in seiner Qualität, vor allem bei Knochenerkrankungen, eingeschränkt (Schmidt-Rohlfing, et al., 2009; Tay, et al., 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Ersatzstoffe stellt die allogene Knochenspende dar. Dabei wird Knochen von anderen Menschen verwendet. Dieser wird bei Gelenkersatz gewonnen, aufbereitet und gefriergetrocknet in Knochenbanken gespeichert. Der Nachteil dieses Verfahrens sind die hohen Kosten, welche durch die Aufbereitung und Lagerung entstehen. Die Aufbereitung ist wichtig, um die Übertragung von bakteriellen und viralen Infektionserkrankungen, z.B. AIDS oder Hepatitis, sowie ein erhöhtes Risiko für die Übertragung von Tumorzellen zu verringern. Zudem kommt ein hoher infrastruktureller Aufwand durch den Transport hinzu (Rueger, 1995).

Autologe Knochenersatzmaterialien fördern im Vergleich zu allogenen Knochenersatzmaterialien die Knochenneubildung stärker (Schnettler, et al., 2004), weil durch die Aufbereitungsprozesse von allogenen Knochen wichtige Proteine zerstört werden (Huber, 2006).

Abhilfe sollen industriell hergestellte Knochenersatzstoffe schaffen. Diese sind Biomaterialien aus synthetischen, anorganischen oder biologischen, organischen Verbindungen (Rueger, 1995). Aktuell werden Metalle, Keramiken, Kollagenschwämme und Polymere getestet bzw. bereits in der klinischen Verwendung eingesetzt (Geiger, et al., 2003).

Polymere als Implantate sind mechanisch schwächer als Stahl- oder Titan-Implantate und induzieren eine Fremdkörperreaktion (Windhagen, et al., 2013).

Am häufigsten in der klinischen Anwendung befinden sich aktuell Hydroxyapatit und TriCalcium-Phosphat als Implantatbeschichtungen oder Füllmaterial bei Knochendefekten (Huber, 2006).

Durch die industrielle Herstellung stehen diese Stoffe in unbegrenztem Ausmaß zur Verfügung und können in ihrer Darreichungsform direkt den Anforderungen zur Implantation angepasst werden.

Das Einwachsverhalten kann beeinflusst werden durch Poren in den Knochenersatzstoffen. Durch die Poren können Osteoblasten und mesenchymale Zellen besser in das Implantat hineinwachsen. Dadurch entsteht eine mechanische Verriegelung zwischen dem Implantat und dem umgebenden Knochengewebe. Zusätzlich wird durch die Poren eine Vergrößerung der Oberfläche erzeugt und damit eine höhere Anhaftungsfläche für Osteoklasten und Osteoblasten geschaffen. Auch die

Vaskularisation wird durch die Poren positiv gefördert, indem neue Blutgefäße im Implantat gebildet werden können (Hannink, et al., 2011).

1.5.2 Calcium-Phosphat

Bei zahlreichen Studien hat sich gezeigt, dass Calcium-Phosphat-Material keine Nebenwirkungen im Körper hervorruft und deshalb gut verträglich ist. Es begünstigt die Knochenheilung, indem es osteokonduktiv wirkt. Das bedeutet, dass das Knochenersatzmaterial als Leitgerüst für die Knochenzellen dient (Vater, et al., 2010). Der bekannteste Stoff in dieser Gruppe ist Hydroxylapatit als Kristallmodifikation von Calcium-Phosphat. Hydroxylapatit weist eine ähnliche Kristallstruktur wie Knochenmaterial auf und ist dadurch gut geeignet als Knochenersatz (Huber, 2006; Xie, et al., 2004). Weiterhin ist bekannt, dass Hydroxylapatit die Aktivierung von Osteoblasten begünstigt sowie das Einwachsen von Blutgefäßen steigert (Xie, et al., 2004).

Es zeichnet sich zusätzlich durch eine vielseitige Verwendungsfähigkeit aus, indem es als Paste verwendet werden kann und sich dadurch der Größe und Form des Defektes optimal anpasst. Der Nachteil von Hydroxylapatit ist jedoch, dass es nicht vollständig resorbierbar ist (Bloemers, et al., 2002).

Deshalb werden zur Zeit zahlreiche resorbierbare Calcium-Phosphat-Implantate klinisch getestet. Sie unterscheiden sich in ihrer Resorptionsgeschwindigkeit und Stabilität. Die Resorption wird beeinflusst durch die Kristallinität der Stoffe, den Sinterungsprozess (Erhitzungsprozess) bei der Herstellung und die Mikroporengröße. Bloemers et al. haben bei ihrer Untersuchung einer resorbierbaren Calcium-Phosphat-Keramik gezeigt, dass diese, in Bezug auf die Resorption, vergleichbar ist mit autologen Knochenersatzmaterialien (Bloemers, et al., 2002).

Der größte Nachteil von Calcium-Phosphat-Keramiken ist die nicht ausreichende Stabilität in tragenden Knochen (Hannink, et al., 2011).

Calcium-Phosphat-Zement als selbstaushärtende Paste wird in der Chirurgie bereits zur Füllung von Knochendefekten verwendet (Vater, et al., 2010). Diese muss bisher aber vor der Benutzung erst noch aus einem Pulver und einer Lösung angemischt werden. Auch bei Calcium-Phosphat-Zementen kann durch die Veränderung der Nanokristallstruktur des Zements das Einwachsverhalten in den Knochen gesteigert werden, ohne den Zement zusätzlich mit teuren Wachstumsfaktoren wie bone morphogenetic protein (BMP) zu versetzen. Durch eine feinere Nanostruktur wird eine Oberflächenvergrößerung erreicht und ein ähnlicher Aufbau wie bei natürlichen Knochen erzielt (Thorwarth, et al., 2005). Vater et al. haben gezeigt, dass dadurch auch eine höhere Stabilität sowie eine höhere Druckfestigkeit erreicht werden können

(Thorwarth, et al., 2005; Vater, et al., 2010). Pastenförmige Knochenersatzmaterialien können nur an nicht lasttragenden Stellen im Körper implantiert werden (Großardt, et al., 2010).

1.5.3 Eisenfestkörper

Poröse Materialien sind dem Knochenaufbau der Spongiosa nachempfunden (Glorius, et al., 2011). Bereits 1943 begann man mit ihrer Erforschung, um sich das Gleichgewicht zwischen Festigkeit und Steifigkeit des Knochens zunutze zu machen (Ryan, et al., 2005).

Durch porenbildende Materialien wird versucht, die Steifigkeit eines festen Materials zu umgehen und eine höhere Elastizität zu erreichen. Damit soll auch die Implantatlockerung verringert werden. Diese tritt bei festen Materialien durch die fehlende Elastizität und die Differenz zwischen festem künstlichen Material und dem weichen Knochen auf. Somit ermöglichen die Poren eine höhere Stabilität des Implantats im Knochen durch ein leichteres Knocheneinwachsen in das Implantat (Robertson, et al., 1976; Wazen, et al., 2010).

Durch die Poren wird die Materialoberfläche vergrößert und damit auch die Stabilität im Knochen erhöht (Ryan, et al., 2005; Wazen, et al., 2010). Zusätzlich wird durch die Poren die Implantatoberfläche rauer und damit eine höhere Zelladhäsion, im Vergleich zu glatten Materialien, erreicht. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Osteoblasten durch eine raue Oberfläche erhöht wird (Lumetti, et al., 2016).

Auch die Gefäßeinsprossungen in das neu gebildete Knochengewebe werden durch die Poren gefördert (Ryan, et al., 2005).

In den 1970er Jahren wurde mit der Forschung an porösen Materialien begonnen. Dafür wurden verschiedene Materialien getestet. Tierversuche wurden mit Keramik, polymeren und metallischen Materialien durchgeführt. Es zeigte sich dabei, dass Keramiken nicht als Porenmaterial geeignet sind, weil durch die Poren die Stabilität der Keramik nachlässt. Ähnlich war es bei den Polymer-Systemen mit Poren. Metalle haben in Bezug auf die mechanische Festigkeit und Elastizität daher im Vergleich zu Keramiken und Polymeren das größte Potenzial (Ryan, et al., 2005).

Eisen ist ein natürlicher Bestandteil unseres Körpers. Aber Eisen kann nicht aktiv über die Niere aus dem Körper ausgeschieden werden. Deshalb ist bei Eisenimplantaten eine Legierung zwingend notwendig, um die Korrosion von Eisen zu verlangsamen und damit die Bildung von zytotoxischen Stoffen zu verhindern. Gleichzeitig wird durch die Legierung die Oberflächenhaftung für neugebildete Knochenzellen begünstigt (Peuster, et al., 2006). Mit einer Hydroxylapatitbeschichtung kann dieser Effekt erzielt

werden, weil Hydroxylapatit bioaktiv ist und die Bindung an Knochengewebe unterstützt (Glorius, et al., 2011).

1.5.4 Magnesium-Calcium-Phosphat

Magnesium scheint eine Wirkung zur Förderung der Knochenbildung und der Angiogenese zu besitzen sowie gleichzeitig eine hemmende Wirkung auf die Osteoklastenfunktion (Xia, et al., 2016; Thormann, et al., 2014). Das Einwachsverhalten von neugebildeten Knochen wird durch Magnesium positiv beeinflusst (Schendel, et al., 2009). Des Weiteren haben andere Untersuchungen gezeigt, dass Magnesiumzement schnell aushärtet und damit eine frühe Festigkeit bietet (Soltmann, et al., 2011). Magnesium ist genauso wie Calcium-Phosphat ein natürlicher Bestandteil des Körpers.

Schendel et al. haben bei ihren Untersuchungen mit Magnesiumzement keine entzündliche Gewebereaktion beobachtet. Sie stellten eine schnelle Resorption vom Zement und eine gute Oberflächenhaftung zwischen dem Magnesiumzement und dem umliegenden Knochengewebe fest (Schendel, et al., 2009).

Auch bei Magnesiumlegierungen wurden eine gute Biokompatibilität und osteokonduktive Eigenschaften nachgewiesen (Windhagen, et al., 2013).

Die Abbaurate von Magnesium ist sehr hoch. Magnesiumzement wird deshalb schneller abgebaut als Calcium-Phosphat-Zement (Wen, et al., 2013).

Durch die Kombination von Magnesium und Calcium-Phosphat in einem Zement kann die Abbaurate von Magnesium-Zement gesenkt werden und die von Calcium-Phosphat-Zement gesteigert werden. (Charyeva, et al., 2014).

Es muss unterschieden werden zwischen Magnesium-basierten Implantaten als Festkörper und Magnesiumzement. Bei den Festkörpern wurde eine Gasbildung nachgewiesen (Windhagen, et al., 2013). Diese konnte bei Magnesiumzementen nicht festgestellt werden (Charyeva, et al., 2014).

Abbaubare, auf Magnesium basierende, intravaskuläre Stents ergeben gute klinische Werte und sind biokompatibel (Bose, et al., 2006).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich von bekannten und neu entwickelten biodegradierbaren Stoffen bezüglich ihrer Eigenschaften des Bioremodeling, der Resorbierbarkeit, Stabilität und Verträglichkeit sowie die Testung einer neuen Darreichungsform von einer bekannten Zementmischung. Hierzu wurden histologische und molekularbiologische Verfahren verwendet.

Als Versuchsaufbau wurde ein Großtiermodell, das Schaf, gewählt. So sollte eine vergleichbare Knochenbelastbarkeit wie beim Menschen erreicht werden. Des

Weiteren besitzen Schafe einen ähnlichen Knochenstrukturaufbau und ein ähnliches Gerinnungssystem wie der Mensch (Wissing, et al., 1990). Bei den verwendeten Stoffen wird zum einen auf einen bekannten und bereits in seiner effektiven Funktion bestätigten Calcium-Phosphat-Zement zurückgegriffen. Dieser liegt als gebrauchsfertige Paste vor und soll somit in seiner neuartigen Darreichungsform getestet werden. Zum anderen wurde ein Zement aus Blut und Calcium-Phosphat-Zement durch ein speziell angefertigtes Mischsystem hergestellt. Das Blut wurde vor dem Anmischen vom Tier gewonnen. Bei dieser Methode, dem Vermischen von Zement und Blut, wurde auf ein klinisches Verfahren zurückgegriffen, welches bereits verwendet wird. Dabei wird Knochenmark mit Kompositen von Calcium-Phosphat und Kollagen vor der Einbringung in den Knochendefekte vermischt (Einhorn, 2003).

Zusätzlich wurde eine Pulvermischung, bestehend aus Magnesium und Calcium-Phosphat, verwendet. Diese Pulvermischung wurde vor der Benutzung zunächst mit Ammoniumphosphat-Lösung angemischt. Magnesiumzement soll als schnell resorbierbarer Zement im Vergleich zum langsam resorbierbaren Calcium-Phosphat-Zement getestet werden.

Zusätzlich wurde ein neuartiger Stoff verwendet, ein poröser Eisenschaumfestkörper. Bereits in der Stent-Therapie bei Gefäßerkrankungen haben Eisenstents gute Ergebnisse erzielt (Francis, et al., 2015). Es soll untersucht werden, wie schnell Eisen im Knochen abgebaut wird und wie verträglich der Eisenschaumfestkörper im Körper ist.

So werden bekannte Verbindungen mit neuen kombiniert. Für diese Untersuchung wurde ein Eisenschaumkörper mit Calcium-Phosphat-Zement gefüllt. Dadurch entsteht ein formstabiler Festkörper, welcher auch in lasttragenden Stellen im Körper implantiert werden kann; im Gegensatz zu Knochenersatzzement, welcher lediglich in nicht lasttragende Stellen implantiert werden kann.

Bei beiden Eisenschaumfestkörpern war die Zielsetzung bei der Entwicklung, ein Gelenkersatzimplantat herzustellen, welches zum einen lasttragend ist und zum anderen gut im Knochen verankert wird. Durch die Verankerung soll eine Implantatlockerung vermieden werden.

2 MATERIAL und METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für den Versuch wurden 20 weibliche Merino-Wollschafe verwendet, welche zwischen 3 und 5 Jahre alt waren und ein Körpergewicht zwischen 75 und 107 kg aufwiesen. Diese Tiere stammten vom Oberen Hardthof Gießen, Fachbereich 9, Justus Liebig Universität Gießen.

Vor den Operationen wurden alle Tiere vom Tierarzt auf Infektionskrankheiten und Verletzungen untersucht, es wurde jedoch nichts Auffälliges festgestellt. Weiterhin wurden sie bereits 2 Wochen vor Operationsbeginn in Ställen untergebracht, damit sie sich eingewöhnen konnten.

Zur Identifikation trugen die Tiere Ohrmarken und –stempel.

Die vorliegende Studie wurde vom Regierungspräsidium Darmstadt 02/2010 genehmigt. Und ist unter folgender Tierversuchsnummer gelistet: V54-19c 20/15-F31/27.

Die 20 Tiere wurden gleichmäßig auf vier Zeiträume (1, 3, 6 und 18 Monate) aufgeteilt. Innerhalb dieser Zeiträume erfolgte eine weitere Untergruppeneinteilung für die fünf verschiedenen Implantate auf die einzelnen Bohrlochdefekte, welche sich sowohl im linken Femur / der linken Tibia sowie im rechten Femur / der rechten Tibia der hinteren Extremitäten befanden. Auf eine Kontrollgruppe mit Leerdefekten wurde auf Grund von Erfahrungen einer unveröffentlichten Vorstudie der Firma InnoTERE verzichtet. Die Tiere wurden von 5 beginnend bis 24 nummeriert. In der Vorstudie des Versuches wurden die Tiere mit 1 bis 4 nummeriert. Daher wurde entschieden, dass bei der eigentlichen Hauptstudie die Nummerierung fortgeführt wird.

Diese Zuteilung erfolgte zunächst randomisiert, musste aber im Verlauf der Studie auf Grund von Implantationsschwierigkeiten manuell angepasst werden, um zu ermöglichen, dass alle Implantate in einer Gruppe zu gleichen Teilen vertreten sind. Dies war leider nicht immer möglich.

Ein Tier (Schaf 18) verstarb aus ungeklärter Ursache frühzeitig und wurde deshalb nicht in die Ergebnisse einbezogen.

Die Tiere wurden in der Zentrale Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums Frankfurt gehalten und von den dortigen Tierärzten betreut. Auch die Operationen fanden dort statt. Die Tiere erhielten Wasser, Heu und Kraftfutter. Sie wurden prä- und postoperativ in mit Heu ausgelegten Einzelboxen (Innengehege) gehalten.

Postoperativ bis zum Wundheilungsabschluss wurden die Tiere täglich von einem Tierarzt begutachtet und auf Wundverhältnisse, Fressverhalten und das Gangbild untersucht.

Nach der abgeschlossenen Wundheilung wurden sie auf eine Weide gebracht, wo sie artgerecht in Herden gehalten wurden.

2.2 Materialien

Zur Untersuchung standen fünf verschiedene Materialien zur Verfügung. Diese wurden von der Firma InnoTERE aus Dresden entwickelt und zur Verfügung gestellt.

2.2.1 Fertigpaste in Spritze

Calcium-Phosphat-Zement wird praktisch ausschließlich durch zelluläre (vorwiegend osteoklastäre) Resorption abgebaut und so in den Knochenstoffwechsel einbezogen. In der ausgewählten Rezeptur gilt der Calcium-Phosphat-Zement bei Implantation in den spongiösen Knochen des Schafs als ausgesprochen langsam resorbierbar.

Die Grundlage der Rezeptur war der bekannte Biozement D, der ursprünglich von Driessens et al. entwickelt wurde (Khairoun, et al., 1997). Dabei ist enthalten 60 wt.% α -TCP (α -Ca₃(PO₄)₂), 26 wt.% DCPA (CaHPO₄), 10 wt.% Calciumcarbonat (CaCO₃) und 4 wt.% gefälltes Hydroxylapatit HA (Heinemann, et al., 2013).

Durch den Einsatz von gebrauchsfertiger Paste entfällt die aufwendige Vorbereitungszeit durch den Mischprozess. Daher wurde die Bezeichnung 1P-CPC für diesen Stoff gewählt.

Die Paste kann aufgrund ihrer hohen Stabilität ohne Zeitdruck eingebracht werden. Die Gefahr, dass der Zement bereits vor der Einbringung aushärtet, ist damit nicht gegeben (Vorndran, et al., 2013).

Auch unterschiedliche Zementqualitäten, welche bei der Vorortmischung von Pulver und Flüssigkeit vorkommen, treten bei einer bereits vorgemischten Paste nicht mehr auf (Ishikawa, 2003).

Durch die Wahl einer Paste wird ein leichteres Gebrauchen intraoperativ gewährleistet. Die Paste passt sich dem Defekt an und füllt diesen vollständig aus.

Die Abbindereaktion des Calcium-Phosphat-Zements mit den Körperflüssigkeiten erfolgt nach Implantation am Implantationsort. Dabei diffundiert Wasser aus den Körperflüssigkeiten im Bohrloch in den Zement (Vorndran, et al., 2013).

2.2.2 Eisenschaum ohne Zement

Der Eisenschaum ist in seinem strukturellen Aufbau dem des Knochens nachempfunden und weist somit eine vergleichbare Druckfestigkeit und Elastizität wie der spongiöse Knochen eines Menschen auf. Die interkonnektierenden Poren sollen das Einwachsen von Knochenzellen weiter fördern und somit ein gutes Einwachsverhalten auslösen (Glorius, et al., 2011). Es wurde ein gutes Verhältnis zwischen offener Porenstruktur und genügend mechanischer Stabilität gewählt.

Der verwendete Eisenschaum hat eine offene Porosität von 85% und eine Porengröße von 45 Poren pro Zoll. Die Poren sind zu 100% miteinander verbunden (Glorius, et al., 2011).

Zusätzlich wurde der Eisenschaum mit Hydroxylapatit beschichtet, um einen direkten Kontakt zwischen den knochenbildenden Zellen sowie resorbierenden Zellen und dem Eisen zu verhindern und damit die Zellen vor toxischen Abbauprodukten bei der Korrosion zu schützen. Durch die Beschichtung wurde zusätzlich eine bessere Anhaftung der Knochenzellen am Implantat erzielt (Glorius, et al., 2011). In vorangegangenen in vitro Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass der verwendete Eisenschaum die Proliferation von Knochenzellen nicht beeinträchtigt (Wolf-Brandstetter, et al., 2009).

2.2.3 Eisenschaum mit Calcium-Phosphat-Zement (Eisenschaum-CPC)

Der Eisenschaum wurde mit Hydroxylapatit-Beschichtung und für eine bessere Stabilität zusätzlich mit Calcium-Phosphat-Zement befüllt. Vorstudien haben gezeigt, dass durch die Füllung eine höhere Druckkraft, Stabilität und eine niedrigere Verformung gewährleistet werden kann (Glorius, et al., 2011). Somit wurde ein Implantat erzeugt, welches auch an lasttragender Stelle im Körper implantiert werden kann und so auch als Gelenkersatz möglich wäre.

2.2.4 2P-CPC-Aspirat

Das Zwei-Pasten-Calcium-Phosphat-Zement-Aspirat (2P-CPC-Aspirat) Implantat kann als Abwandlung vom 1P-CPC angesehen werden, da die Grundzementsubstanz die gleiche ist. Nur wird beim 2P-CPC-Aspirat Implantat der 1P-CPC mit peripherem Blut, das aus einer Ohrvene gewonnen wurde, durch einen speziellen Durchmischer vermengt. Ursprünglich sollte das Blut für die Vermischung mit dem Calcium-Phosphat-Zement aus dem Bohrloch aspiriert werden, um eine Mischung aus Blut und Knochenmark zu erhalten. Dies war aber durch zu geringe Blutung im Bohrloch nicht möglich, weshalb peripheres Blut verwendet werden musste.

Im Blut enthalten sind Zellen des Monozyten-Systems, die sich zu Osteoklasten bzw. mehrkernigen Makrophagen nach Stimulation differenzieren und mesenchymale Stammzellen, die sich zu Prä-Osteoblasten und Osteoblasten weiter entwickeln.

Die Abbindereaktion des 2P-CPC-Aspirat erfolgt, anders als beim 1P-CPC, zwischen Zement und Blut. Durch den Vermischaufsatz findet die Reaktion beim Einbringen in das Bohrloch statt.

2.2.5 *Magnesium-CPC*

Magnesium-Calcium-Phosphat-Zement (Mg-CPC) unterscheidet sich von dem 1P-CPC durch eine teilweise Substitution des Calcium-Phosphats durch Magnesium-Phosphat und durch die Verwendung einer Ammoniumphosphat-Lösung als Anmischflüssigkeit.

Der abgebundene Zement besteht aus Magnesium-Ammoniumphosphat und Calcium-Phosphat und bewirkt durch seine höhere Löslichkeit eine erhöhte Resorbierbarkeit von Mg-CPC im Vergleich zu 1P-CPC.

Somit wurden zwei Zementarten gewählt, bei denen bekannt war, dass der eine (1P-CPC) langsam und der andere (Mg-CPC) schnell resorbiert wird.



Abbildung 3: Pasten-CPC



Abbildung 4: Eisenschaum ohne Zement



Abbildung 5: Eisenschaum-CPC



Abbildung 6: Magnesium-CPC



Abbildung 7: 2P-CPC-Aspirat

2.3 Implantation der Osteosynthesematerialien

2.3.1 Narkose

Die Tiere wurden im Innengehege, in Einzelboxen, prämediziert mit 10 mg/kg Ketamin (CEVA Sante Animale, Libourne, Frankreich), 0,1 mg/kg Xylazin (Bayer, Leverkusen, Deutschland) und 0,3 mg/kg Midazolam (Ratiopharm, Ulm, Deutschland). Die Prämedikation erfolgte intramuskulär (i.m.). Danach wurden die Hinterläufe geschoren und das Tier gewogen. Im Operationsvorbereitungsraum wurde das spätere Operationsgebiet mit Pilca Enthaarungscreme (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Bühl, Deutschland) behandelt. Es wurde ein arterieller und venöser Zugang gelegt. Die Einleitung erfolgte mit 4 mg/kg Propofol (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und 0,5 mg/kg Fentanyl (B. Braun, Melsungen, Deutschland). Nach der Intubation wurde das Tier in Rückenlage auf dem Operations-Tisch gelagert und fixiert. Des Weiteren wurde das Monitoring angelegt, welches aus Blutdruck (arteriell) und Pulsmesser sowie der Blutsättigungsmessung bestand. Eine Magensonde wurde gelegt und der Kopf nach unten gelagert. Die Beatmung erfolgte maschinell. Mit 40 mg/kg pro Stunde (h) Propofol 2% wurde die Narkose aufrechterhalten. Die Tiere erhielten als Antibiotikaphylaxe vor der Operation 5 ml Veracin compositum (Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) subcutan (s.c.).

2.3.2 Operation

Das Operationsgebiet wurde mit Bronol (B. Braun, Melsungen, Deutschland) gereinigt und steril abgedeckt. Danach erfolgt der im Mittel 6 cm große Hautschnitt, welcher medial in Höhe des Kniegelenks gelegen war, etwa einen Fingerbreit neben dem Ligamentum patellae.

Das Operationsgebiet wurde leicht frei präpariert, wobei das Gelenk nur grob dargestellt wurde, der Gelenkspalt wurde nicht eröffnet. Als Orientierungspunkt für das Femurb Bohrloch diente das Dreieck aus Epiphysenfuge (Oberkante), Innenband (Seitenbegrenzung) und gedachter Verbindungslinie zwischen Epiphysenfuge und Innenband (Seitenbegrenzung). Das Loch in der Tibia wurde etwas unterhalb vom Ansatz des Innenbandes und einen Fingerbreit neben dem Innenband gesetzt. Als zusätzliche Orientierung diente die Vena genu.

Die Knochendefekte wurden mit Hilfe einer innengekühlten Diamanthohlfräse, Diamant Bone Cutting System (DBCS) der Firma Biomet Merck aus Darmstadt, Deutschland, erstellt (Außendurchmesser 9,8 mm und Innendurchmesser 8,6 mm) (siehe Abbildung 8). Mit dem DBCS können standardisierte artefaktfreie Defekte gesetzt werden. Das System wurde mit 0,9% Natriumchlorid (NaCl) (B.Braun) gekühlt,

um Hitzenekrosen zu vermeiden und gleichzeitig abgeschliffenes Material aus dem Bohrloch zu entfernen (Schnettler, 1993).

Die laufende Fräse wurde aus dem Knochen entfernt, nachdem die gewünschte Bohrlochtiefe von 20 mm erreicht war. Die Bohrlochtiefe wurde mit der Skalierung auf der Außenseite der Fräse bestimmt (siehe Abbildung 9).

Der Knochenzylinder wurde mit Hilfe eines im Durchmesser 8,5 mm großen Extraktors entnommen, indem dieser zunächst mit einem Hammer in den Fräsenkanal getrieben und dann nach einer Drehung wieder entfernt wurde. Es folgte der Verschluss des Defekts mit der jeweiligen Prüfsubstanz (siehe Abbildung 12; 13; 14;15;16).

Der Durchmesser bei den Eisenschaumimplantaten (Eisenschaum-CPC und Eisenschaum ohne Zement) schwankte zwischen 10,14 mm und 10,43 mm. Diese Schwankungen konnten produktionsbedingt nicht verringert werden. Daher wurden die Bohrlöcher, welche für die beiden Festkörper vorgesehen waren, zusätzlich mit einer Diamantkegelfräse (ARTICO med, Schlüchtern, Deutschland) geweitet. (siehe Abbildung 17) Dennoch kam es aufgrund der Größenschwankungen vereinzelt zu Beschädigungen der Festkörper-Implantate bei der press-fit Einbringung (siehe Auflistung Implantatbeschädigung am Ende des Kapitels) (siehe Abbildung 18).

Nach Einbringen der Materialien in Femur und Tibia der Hinterbeine wurden die Faszien-schichten mit (3-0) Vicryl Fäden (Johnson&Johnson, Norderstedt, Deutschland) genäht. Die Haut wurde anschließend bei Tier 5 bis Tier 17 mit (3-0) Propylen Fäden (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Da dieser Faden nicht resorbierbar ist, musste er nach abgeschlossener Wundheilung wieder entfernt werden. Deshalb wurden anschließend bei den übrigen Tieren (18-24) resorbierbare Fäden (Vicryl) verwendet. Als Schutz wurde die Wunde mit Klebepflastersprühverband OpSite (smith&nephew, Hamburg, Deutschland) abgedeckt.

Als Schmerzmedikation erhielten die Tiere i.m. 0,01 mg/kg Temgesic (Reckitt Benckiser Pharmaceutical, Richmond, USA). Zusätzlich wurde jedem Tier ein Transtec-Pflaster (Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) am rechten Bein mit vier Stichen angenäht.



Abbildung 8: Bohren des Loches mit manueller Kühlung

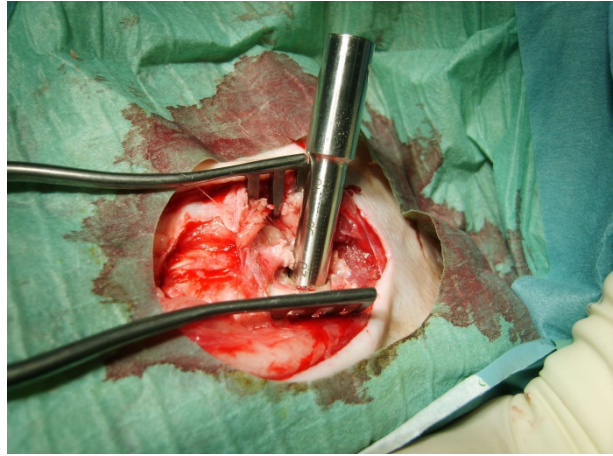


Abbildung 9: Abmessen Bohrlochtiefe



Abbildung 10: Bohrloch



Abbildung 11: Knochenzylinder



Abbildung 12: Einfüllen von Mg-CPC

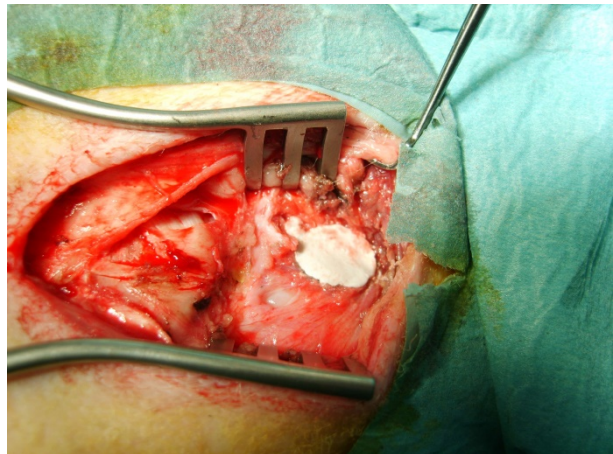


Abbildung 13: gefülltes Bohrloch mit Zement

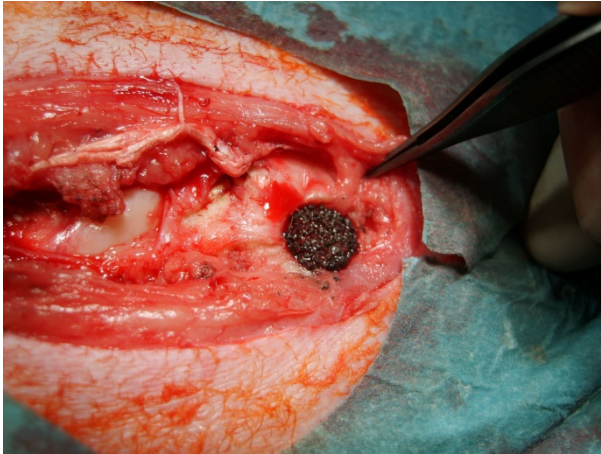


Abbildung 14: Bohrloch gefüllt mit Eisenschaum

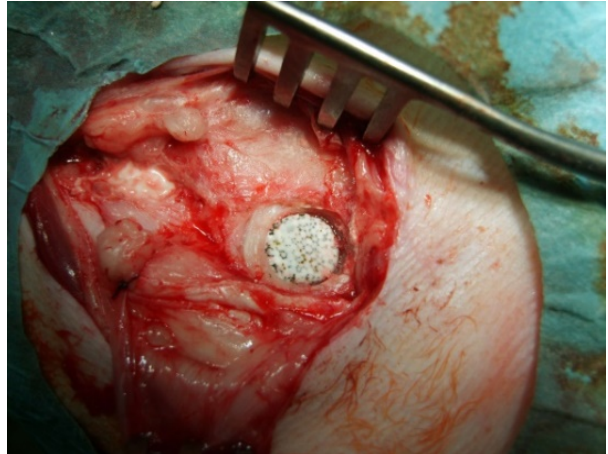


Abbildung 15: Bohrloch gefüllt mit Eisenschaum-CPC

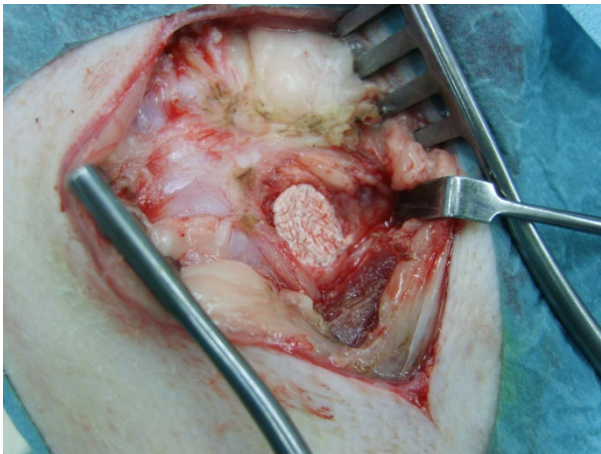


Abbildung 16: Bohrloch gefüllt mit 2P-CPC-Aspirat

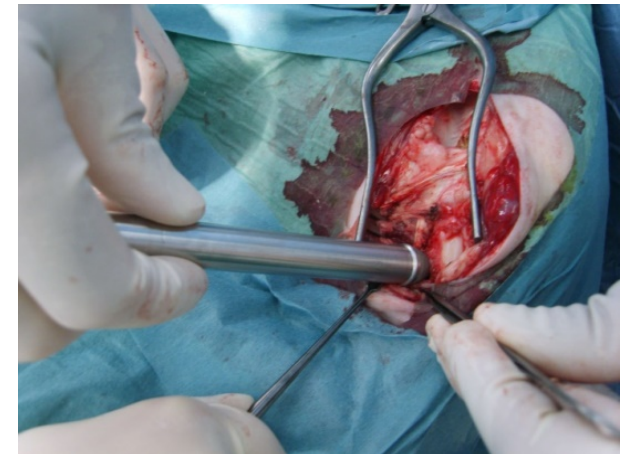


Abbildung 17: Aufweiten des Bohrlochs

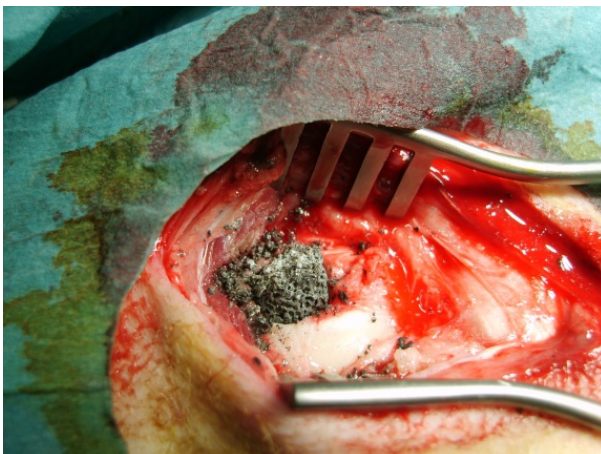


Abbildung 18: Beschädigung des Implantates Eisenschaum bei der Einbringung



Abbildung 19: Verschluss des Weichgewebes

2.3.3 Postoperative Versorgung

Für den Aufwachprozess aus der Narkose wurden die Schafe einzeln in mit Stroh ausgelegten Innenboxen untergebracht. Alle Tiere konnten bereits ca. 2 h postoperativ wieder aufstehen. Ab dem 1. postoperativen Tag wurden mehrere Tiere zusammen im Außengehege untergestellt und nach abgeschlossener Wundheilung auf eine Weide gebracht.

Sie erhielten für 2-3 Wochen täglich eine Temgesic (Reckitt Benckiser Pharmaceutical) 1 ml Spritze i.m. gegen die Schmerzen. In den ersten Tagen erfolgte auch erst nach Gabe der Schmerzmedikation eine Nahrungsaufnahme.

Zur Gewichtsstabilisierung wurde Schweinefutter verfüttert.

Zur Prophylaxe wurde am 2. und 4. postoperativ Tag 5 ml Veracin compositum (Albrecht GmbH) i.m. injiziert.

2.4 Euthanasie

Die Euthanasie von jeweils 5 Tieren erfolgte postoperativ nach den Standzeiten von 1, 3, 6 und 18 Monaten. Einige Tiere zeigten Zeichen von Schmerzen und wurden deshalb nach einer früheren Standzeit, als eigentlich für sie vorgesehen, euthanasiert.

Prämediziert wurden sie im Innengehege mit 10 mg/kg Ketamin (CEVA Sante Animale), 0,1 mg/kg Xylazin (Bayer) und 0,3 mg/kg Midazolam (ratiopharm) i.m. Anschließend wurden sie erneut gewogen und die Hinterbeine geschoren. Die schmerzlose Tötung erfolgte mit 25 ml Narcoren (Merial, Hallbergmoos, Deutschland). Nach Eintreten des Todes wurden die Kniegelenke beider Hinterläufe eröffnet und jeweils der distale Femur und die proximale Tibia herausgenommen. Die Knochen wurden für die Aufbereitung und die Konservierung der Zell- und molekularbiologischen Methoden in Knochenscheiben von 2-3 mm Dicke mit der Knochensäge Exakt Typ 8y (Exakt, Neustadt, Deutschland) gesägt.

Eine Scheibe je Knochen wurde in Yellow Fix Fixierung (im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Universität Gießen hergestellt) gegeben für die spätere Epon Bearbeitung. Eine Scheibe wurde Schock-gefroren in flüssigem Stickstoff für die Molekularbiologie und die restlichen Scheiben in 4% Paraformaldehydlösung (PFA) (Merck, Mannheim, Deutschland) für die Einbettung in Paraffin und Technovit 9100 gelagert.

2.5 Molekularbiologische Untersuchung

2.5.1 Lagerung der Scheiben

Die Scheiben für die molekularbiologische Untersuchung wurden nach der Euthanasie sofort für den Transport in Stickstoff gelagert und dann in -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.5.2 RNA Isolierung

Dabei wurden zunächst aus dem Knochen ca. 6 mm x 6 mm große Stücke mit Kontakt zum Implantat (Interface Zone) aus den gefrorenen Knochenscheiben herausgeschnitten. Das Knochenstück wurde mit Hilfe eines Mörsers und anschließend mit einem Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Deutschland) (Abbildung 20) unter Zugabe von 1 ml Trizol (Spill Emergency Response, North America) homogenisiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten (min) wurden 200 µl Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben, geschüttelt und 5 min inkubiert. Durch Zentrifugation für 15 min bei 12000 g und 4°C wurden die Phasen getrennt. Der RNA-haltige Überstand (Abbildung 21) wurde abgenommen und zur weiteren Aufbereitung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde mehrmals invertiert, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 min 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Abbildung 22) wurde mit 1 ml 75% Ethanol (J:T:Baker, Deventer, Niederlande) vermischt und erneut zentrifugiert (5 min, 7500 g, 4°C).

Das Pellet (Abbildung 23) wurde bei 37°C im Brutschrank getrocknet, je nach Pellet-Größe in unterschiedlichen Mengen DEPC-Wasser (Sigma-Aldrich) gelöst und der RNA-Gehalt photometrisch bestimmt. Bei den Proben der 18-Monatstiere wurde zur Messung ein UV-Spektrometer (Biochrom, Cambridge, England) benutzt. Zur Lagerung wurden die Proben bei -80°C tiefgefroren.



Abbildung 20:
Ultra-Turrax

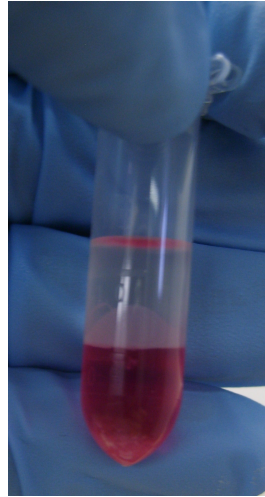


Abbildung 21: RNA
Überstand



Abbildung 22:
2.RNA Ethanol-gemisch

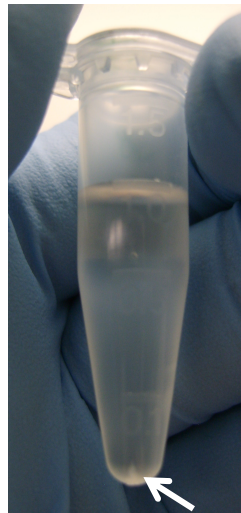


Abbildung 23: Pellet

2.5.3 cDNA Synthese

Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde der Quantitect Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu verhindern, wurde die RNA für 2 min bei 42°C im gDNA Wipeout Buffer (Qiagen) inkubiert. Anschließend wurden eine Positivprobe und eine Negativprobe zur Kontrolle hergestellt. Für die Positivprobe wurde ein Reverse Transkriptase Mastermix (RT-Mix), bestehend aus Reverse Transkriptase, Puffer und Reverse Transkriptase Primer Mix (Qiagen), hergestellt. Für die Negativprobe wurde ein RT-Mix, bestehend aus Puffer, Reverse Transkriptase Primer Mix (Qiagen) und RNase-free water anstelle von Reverse Transkriptase, verwendet. Diese wurden hinzupipettiert und bei 42°C für 30 min inkubiert und anschließend für 3 min bei 95°C inaktiviert. Diese Reverse Transkription wurde am Thermal Cycler (Techne, Jahnstorf, Deutschland) durchgeführt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.4 Real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Real-time RT-PCR)

Mit Hilfe der Real-time RT-PCR konnte nicht nur die cDNA vervielfältigt werden, sondern es erfolgte auch eine Analyse, wie viele Produkte von Markern des Knochenaufbaus und Abbaus gebildet wurden. Dabei wurde die Fluoreszenz-Messung genutzt, in der SYBR-Green in bestimmte DNA-Abschnitte eingelagert wurde. Als Knochenaufbaumarker wurden Kollagen 1 und Osteocalcin gewählt. Kathepsin K wurde als Resorptionsmarker ausgewählt. Um die Zell-Zell-Interaktion beurteilen zu können, wurde zusätzlich noch Cx43 als Primer benutzt. Als house-keeping Gen/Referenz-Gen wurde β 2-Mikroglobulin gewählt.

Die Real-time RT-PCR wurde mit dem Light Cycler (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Hierfür wurden jeweils 1 μ l cDNA; 12,5 μ l QuantiFast SYBR Green PCR Mastermix (Qiagen, Hilden, Deutschland); 0,5 μ l der entsprechenden Forward und Reverse Primer (je 20 μ M) und 11 μ l H₂O eingesetzt. Zunächst wurden die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend folgten Annealing- und Elongationsschritte mit 40 Wiederholungen mit je 10 Sekunden (s) bei 95°C und 30 s bei 60°C. Für die anschließende Schmelzkurve wurde zunächst 95°C für 15 s und 60°C für 15 s gehalten. Anschließend wurde die Temperatur um 0,1°C/s bis auf 95°C erhöht. Zum Abschluss wurde auf 4°C herunter gekühlt.

2.5.5 Etablierung der Primer

Die Primer wurden basierend auf den in der Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) veröffentlichten Gensequenzen mittels Primersuchprogramm (frodo.wi.med.edu/cgi-bin/primer3/primer3.www.cgi) herausgesucht und mit dem BLAST-Computerprogramm (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) auf Spezifität geprüft. Die Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Bei der Gensequenzssuche von Kathepsin K vom Schaf in der Genbank wurde festgestellt, dass diese Sequenz noch nicht bekannt ist. Deshalb wurde ein anderer Weg gewählt.

Zunächst wurde aus der Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) die Gensequenz für Kathepsin K vom Rind herausgesucht (NM_001034435.1), da Rinder und Schafe ähnliche Gensequenzen aufweisen.

Dieser Rinderprimer wurde in einer qualitativen PCR mit AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Roche, Branchburg, New Jersey, USA) und Schafsknochen eingesetzt. Das dabei entstandene PCR Produkt wurde der Firma MWG Biotech zur Sequenzierung übermittelt. Anschließend wurde mit dem Primer3 Programm (frodo.wi.med.edu/cgi-bin/primer3/primer3.www.cgi) der passende Primer für Kathepsin K vom Schaf herausgesucht.

Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2 dargestellt.

2.5.6 Real-time RT-PCR für die Zieltargets

Zur Ermittlung der PCR Effizienz und der Spezifität der Real-time RT-PCR wurden zunächst Verdünnungsreihen der cDNA (unverdünnt; 1:10 Verdünnung; 1:100 Verdünnung; H₂O pur) für jedes Zielgen untersucht. Hierfür wurden jeweils 0,2 µl Primer (20 µM), 5 µl QuantiFast Mastermix (Qiagen, Hilden, Deutschland); 1 µl cDNA und 3,8 µl H₂O eingesetzt. Nach initialer Denaturierung bei 95°C für 5 min erfolgten 40 Zyklen mit 10 s Denaturierung bei 95°C und einem gemeinsamen Annealing- und Elongationsschritt für 30 s bei 60°C. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im Annealing- und Elongationsschritt jeder Zyklen. Zur Ermittlung der Schmelzkurve wurden anschließend die PCR Produkte für 15 Sekunden bei 95°C und für 15 s bei 60°C denaturiert und die Temperatur danach, von 60°C ausgehend, jede Sekunde um 0,1°C bis 95°C erhöht.

Die quantitative Analyse erfolgte jeweils mit 1 µl unverdünnter cDNA unter den oben genannten Bedingungen. Sämtliche Ansätze wurden als Duplikate untersucht. Die Untersuchung des Referenz-Gens erfolgte im selben Lauf wie die der Zielgene. Als Negativkontrollen wurden jeweils die RT-Ansätze und zusätzliche Non-Template-

Kontrollen verwendet. Diese Versuche wurden mit dem Light-Cycler (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Die Aufnahme und Auswertung der Werte der quantitativen RT-PCR erfolgten mit der Light Cyler Software Version 4.1 (Roche, Mannheim, Deutschland).

Als Beispiel für die Standardgerade und eine Schmelzkurve wird die von β 2-Mikroglobulin im Folgenden dargestellt.

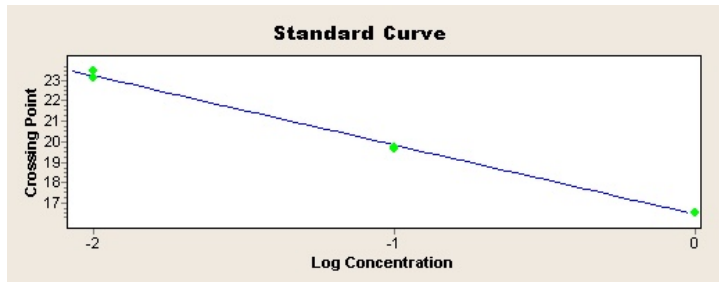


Abbildung 24: Standardgerade der β 2-Mikroglobulin Primer

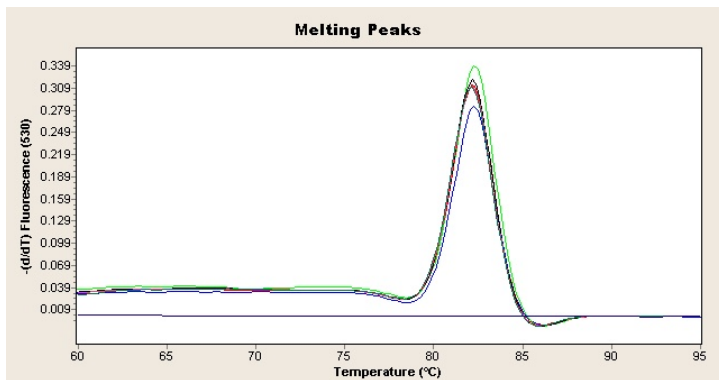


Abbildung 25: Schmelzkurve von β 2-Mikroglobulin

Tabelle 1: Primer-Etablierung

	Effizienz	Korrelations- koeffizient	Steigung der Gerade	Schmelzkurve- maximum
Kollagen 1 α 1	1.9017	0,9998	-3,582	85°C
Osteocalcin	1.8640	0,9996	-3,6975	87°C
Kathepsin K	1.9590	0,9990	-3,4225	84°C
Connexin-43	1.9620	0,9996	-3,4150	82°C
β 2-Mikroglobulin	1.9773	0,9985	-3,6975	82°C

Tabelle 2: Verwendete Primer

Primer für Schaf	Sequenz (5'-3')	Produkt- länge in Basen- paaren	An- nealings- tem- peratur	Genbank- Zugangs- nummer
B2M for rev	CCAGAAGATGGAAAGCCAAA AGCGTGGGACAGAAGGTAGA	159 bp	58°C	NM_0010 09284.1
Col1 for rev	CCAGTCACCTGCGTACAGAACG GCCAGTGTCTCCTTTGGGTCC	245 bp	60°C	AF_12928 7.1
Bglap for rev	CAGCGAGGTGGTGAAGAGAC GCTCATCACAGTCAGGGTTG	122 bp	60°C	NM_0010 4009-1
CtsK for rev	GGGTCAATGTGGTTCCTGTT GCAGCCATCATTCTCAGACA	133 bp	60°C	Nicht publiziert
Cx43 for rev	GGGCTTGCTGAGAACCTACA TGTAACGGCACTCAAGCTG	110 bp	60°C	AY_07471 6

B2M: β 2-Mikroglobulin; Col1: Kollagen-1; Bglap: Osteocalcin; CtsK: Kathepsin K; Cx43: Connexin-43, for: forward Primer, rev: reverser Primer

Primer (5'-3') CtsK Rind

for.: AGAGCCCCAGACTCTGTTGA

rev.: AGCCTTTGTTTCCCCAGTTT

2.5.7 Statistische Auswertung

Die erhaltenen Werte wurden statistisch mit der SPSS-Software (Chicago, USA) analysiert.

Zunächst wurde der Kruskal-Wallis-Test (auch H-Test) mit sämtlichen Proben durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen parameterfreien statistischen Test, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben (Gruppen) hinsichtlich einer Variablen unterscheiden. Mit dem Kruskal-Wallis-Test, der auf den Rangplatzsummen basiert, können mehrere Gruppen verglichen werden. Wenn beim Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede vorlagen, wurde anschließend der Mann-Whitney-Test (U-Test) durchgeführt, der die Signifikanz von Übereinstimmungen zweier Verteilungen überprüft. Beim Mann-Whitney-Test handelt es sich ebenfalls um einen parameterfreien statistischen Test. Als statistisch signifikant werden Unterschiede bezeichnet, bei denen sich eine exakte Signifikanz von $p \leq 0,05$ ergab. Statistisch hoch signifikante Unterschiede ergeben sich bei einer exakten Signifikanz von $p \leq 0,01$.

2.5.8 Graphische Darstellung

Die Ergebnisse wurden als Boxplots dargestellt, um die verschiedenen Streuungs- und Lagemaße in einer graphischen Darstellung zusammenzufassen. Hierbei entspricht die Box dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Der Median wird als durchgehender Strich in der Box eingezeichnet. Weiterhin wird das untere Quartil (25%) durch den Beginn der Box und das obere Quartil (75%) durch das Ende der Box gekennzeichnet. Die T-Striche (oder als Whiskers bezeichnet) markieren den kleinsten (0%) und den größten Datenwert (100%) des Datensatzes. Werte außerhalb der dreifachen Standardabweichung wurden als Ausreißer gewertet und als Kreise gekennzeichnet. Werte von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant und Werte von $p \leq 0,01$ als hoch signifikant gewertet und mit einem Stern bzw. zwei Sternen gekennzeichnet.

2.6 Makroskopische Untersuchung

Nach der Freipräparation eines Knochenstückes und dessen Zersägen in einzelne Scheiben wurden diese fotografiert. Diese Bilder dienten als Grundlage für die makroskopische Auswertung.

Für die makroskopische Auswertung wurde das Resorptionsverhalten, vor allem am Randbereich, beurteilt. Die Fragmentierung und das Einwachsverhalten von Gewebe ins Implantat stellte ein weiteres Kriterium dar, ebenso, ob eine Abstoßungsreaktion zu beobachten sei. Als weiteres Kriterium wurde die Menge an schaumig wirkendem

Gewebe um das Implantat herum gewählt. Die Korrosion spielt bei den beiden Festkörpern eine Rolle, wobei die knöcherne Integration und der Erhalt des Implantats für alle fünf Implantat-Typen betrachtet wurden. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden der Erhalt des Implantats und die Menge an schaumig wirkendem Gewebe um das Implantat herum in Prozent angegeben.

2.7 Histologische Untersuchung

Die Knochenscheiben für die histologische Aufarbeitung wurden zunächst 24 h in 4% Paraformaldehydlösung (PFA) im Kühlschrank fixiert und danach mit 0,1 Molaren (M) Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2-7,4 gewaschen.

Die Knochenscheiben für die Paraffineinbettung wurden in 10% EDTA-Lösung entkalkt. Die Länge der Entkalkung richtete sich nach der Größe der Knochen bzw. nach der Dicke der Knochenscheiben. Der Grad der Entkalkung wurde mit einer spitzen Pinzette geprüft, um festzustellen, wie weich das Gewebe schon ist. Die Proben wurden nach der Entkalkung 1 h unter fließendem Leitungswasser gespült und für die Dehydrierung in 70% Ethanol gelegt, um danach sofort im Paraffin-Einbettautomat weiter entwässert und in Paraffin eingebettet zu werden. Die Einbettung erfolgte mit dem Paraffin-Einbettautomat TP1050 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) und es wurde Programm 10 gewählt (siehe Tabelle 3).

Die so entstandenen Paraffinblöcke wurden mittels eines Rotationsmikrotoms (RM 2155, Leica, Nussloch, Deutschland) in 3-5 µm dicke Schnitte geschnitten und diese mit Toluidinblau und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

Bei der Färbung mit Toluidinblau wurde als Färbergebnis Folgendes beobachtet:

- mineralisierte Hartgewebematrix ist ungefärbt bis blass-blau
- Zellen und Weichgewebe sind unterschiedlich blau
- Knorpelmatrix und Mastzellgranula sind rot-violett
- verkalkte Knorpelmatrix ist dunkelblau gefärbt

Bei der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin wurde Folgendes beobachtet:

- blaue Kerne und rote Muskulatur
- hellrot angefärbtes Bindegewebe
- leuchtend rote Erythrozyten

Die Schliffe und Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Axiophot-2, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet und dokumentiert, indem sie mit der integrierten Kamera abfotografiert wurden.

Für die makroskopische und histologische Beurteilung und Auswertung wurden semiquantitative Kriterien im Vorfeld festgelegt. Diese wurden nach einem Score beurteilt.

0: keine Veränderung

1: leichte Veränderung

2: moderate Veränderung

3: starke Veränderung

Kriterien:

- Fragmentierung bzw. Erschließung der interkonnektierenden Poren:
Hierbei wurde einerseits beurteilt, ob und wie stark das Implantat von Gewebe unterteilt wird, sowie das Einwachsen von Gewebe in die interkonnektierenden Poren der Eisen-Implantate. Die Fragmentierung hatte einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Resorption der Implantate.
- Knöcherne Integration:
Das Augenmerk war hier auf die Bildung von neuem Knochengewebe um die Implantate gerichtet – also, inwiefern sich am Lagerknochen und/oder den neu gebildeten Knochentrabekeln Osteoblasten, Saumzellen, Osteozyten, Osteoblasten-Vorläuferzellen bzw. Osteocalcin-immunpositive Zellen lokalisieren.
Bei der knöchernen Integration spielt die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff eine wichtige Rolle.
- Resorption:
Ziel dieser Studie war die Beurteilung neuer resorbierbarer Materialien nach ihren Resorptionsfähigkeiten und daraus resultierende Anwendungsmöglichkeiten. Resorption und Fragmentierung hängen hierbei eng zusammen. Das Augenmerk der Resorption lag deshalb bei der geschätzten Anzahl und der geschätzten Aktivität der mehrkernigen Makrophagen an den Implantaten. Eine große Anzahl von Osteoklasten am Lagerknochen wurde nicht als positives Zeichen der Implantatresorption beurteilt, sondern vielmehr als Zeichen einer schlechten knöchernen Integration.
- Immunkompetente Zellen:
Dabei wurden die Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten, das vermehrte Vorhandensein von Lymphozyten sowie eine generelle Abstoßungsreaktion beurteilt.

Implantatbeschädigung:

Schaf 6 rechter Femur: Eisenschaum leicht beschädigt

Schaf 7 linke Tibia: Eisenschaum-CPC obere 2/3 abgebrochen

Schaf 8 linker Femur: Eisenschaum oberflächlich beschädigt

Schaf 16 rechter Femur: ein Teil des Eisenschaum-Implantats abgebrochen

Tabelle 3: Programm Paraffin-Einbettautomat

Lösung	Station	Dauer in h	Temperatur		Drain in s	Stir
70% Alkohol	2	2.00	RT	P / V	120	ON
80% Alkohol	3	2.30	RT	P / V	120	ON
96% Alkohol	4	2.00	RT	P / V	120	ON
100% Alkohol	5	3.00	RT	P / V	120	ON
100% Alkohol	6	3.00	RT	P / V	120	ON
100% Alkohol	7	3.00	RT	P / V	120	ON
Xylol	8	1.00	RT	P / V	120	ON
Xylol	9	0.45	RT	P / V	120	ON
Xylol	10	0.45	RT	P / V	120	ON
Paraffin	Left	0.40	58°C	P / V	120	ON
Paraffin	Middle	0.40	58°C	P / V	120	ON
Paraffin	right	0.40	58°C	P / V	120	ON

P / V: Druck und Vakuum. Die Kammer wurde für 90s auf -70 kPa evakuiert, 30 s belüftet, 90 s auf einen Druck von 35 kPa gebracht, 30 s belüftet. Dieser Zyklus wurde alle 4 min wiederholt.

Stir: Rühren

RT: Raumtemperatur

3 ERGEBNISSE

3.1 Lage der Implantate

Aufgrund der Materialgröße konnte nicht bei allen Implantaten eine korrekte Lage im spongiösen Knochen erzielt werden. Bei 47 Implantaten wurde die optimale Lage erreicht. Eine Penetration des Periosts oder der Markhöhle traten bei 23 Proben auf, wobei zwei der Proben nur in sehr engem Kontakt zur Markhöhle lagen, diese aber noch nicht penetriert hatten. Ein Implantat lag sowohl im Markraum als auch im Periost. Bei zwei Implantatorten konnte nach der Euthanasie kein Implantat im Knochen gefunden werden. Warum ist hierbei unklar. Möglicherweise wurde der Knochen falsch angesägt und dadurch das Implantat nicht getroffen.

Einzelne Eisenschaum- und Eisenschaum-CPC Implantate wurden bei der Einbringung beschädigt. Dieses Problem entstand dadurch, dass die Implantate in der Herstellung nicht alle gleich groß herzustellen sind. Trotz dieser Probleme kann, unter der Berücksichtigung der Größe der Implantate (10 mm Durchmesser, 20 mm Länge), von positiven Werten bezüglich der Lage gesprochen werden.

Ein Schaf (Sf 18) verstarb plötzlich. Die genauen Todesursachen wurden nicht untersucht. Es wurde beschlossen, diese Implantate nicht mit in die weiteren Untersuchungen aufzunehmen. Organisatorisch war es nicht möglich, Knochenschnitte von dem plötzlich verstorbenen Tier zu nehmen.

Lokale Entzündungszeichen wie Überwärmung, Rötung, Ödem, Schmerzen und Funktionseinschränkungen konnten vereinzelt bei unzureichender Implantatlage beobachtet werden.

Systemische Unverträglichkeiten wie Haarausfall, starke Gewichtsabnahme und allergische Reaktionen konnten nicht beobachtet werden.

3.2 Pasten Calcium-Phosphat-Zement (1P-CPC)

Im Folgenden werden die makroskopischen Ergebnisse vom 1P-CPC Implantat der einzelnen Standzeiten nach einem, drei, sechs und 18 Monaten aufgeführt. Dabei wurde jeweils nur die Knochenscheibe 3 beurteilt und eine zusammenfassende mikroskopische Beurteilung über die vier Standzeiten erhoben.

Bei den einzelnen Standzeiten stand eine unterschiedliche Anzahl von Proben des 1P-CPC Implantats zur Auswertung zur Verfügung. Aufgrund von Implantationsschwierigkeiten musste eine manuelle Zuordnung der Implantate erfolgen.

Für einen Monat waren es zwei Proben. Für drei Monate waren es fünf Proben. Vier Proben wurden für sechs Monate implantiert und erneut fünf Proben bei 18 Monaten.

3.2.1 *Ein Monat*

Nach einer Standzeit von einem Monat ist ein beginnendes Resorptionsverhalten am Randbereich des Implantats zu erkennen. In den makroskopischen Bildern ist zu sehen, dass der Rand des Implantats angefressen ist. Leichte Fragmentierungen sind ebenfalls am Randbereich zu beobachten, das Implantat ist jedoch noch zu 100% erhalten (Abbildung 26). Schaumiges Gewebe ist um das 1P-CPC Implantat nicht zu beobachten. Das Knochentrabekelwerk reicht bis an das Implantat heran. Eine moderate knöcherne Integration hat stattgefunden. Die Knochentrabekel im direkten Kontakt zum Implantat sind ebenfalls mit Zement gefüllt.

3.2.2 *Drei Monate*

Die Resorption schreitet im Vergleich zur Ein-Monat-Standzeitgruppe am Rand weiter fort. Bei einer von fünf Proben des 1P-CPC Implantats von drei Monaten ziehen Gewebestraßen durch das gesamte Implantat (Abbildung 27). Diese Gewebestraßen scheinen makroskopisch am Randbereich auch mit Knochentrabekeln gefüllt zu sein sowie im Inneren des Implantats mit lockerem Bindegewebe. Bei den restlichen Proben sind nur am Randbereich, wie auch bei einem Monat, Fragmentierungsprozesse zu erkennen. Es ist weniger Implantat erhalten als bei einem Monat. Die knöcherne Integration ist mit der von einem Monat jedoch vergleichbar.

3.2.3 *Sechs Monate*

Die Resorption hat im Vergleich zu drei Monaten bei drei von vier Proben wieder abgenommen und ist mit der von einem Monat zu vergleichen. Nur bei einer Probe des 1P-CPC Implantats von sechs Monaten können auch makroskopisch Gewebestraßen beobachtet werden, die durch das Implantat ziehen (Abbildung 29). Außerdem ist nur bei dieser Implantatprobe der Rand angefressen. Bei den restlichen Proben sieht der Rand sehr rund und unberührt, bis wenig angegriffen durch die Osteoklasten, aus (Abbildung 28). Im Vergleich zu den früheren Standzeiten ist bei sechs Monaten der Rand am unberührtesten. Auch die Resorption des Implantats ist rückläufig im Vergleich zu der Drei-Monats-Gruppe. Die knöcherne Integration dagegen ist bei sechs Monaten stärker ausgeprägt. Sie ist weiter fortgeschritten als bei den früheren Standzeiten. Das umliegende Knochentrabekelwerk erscheint makroskopisch fester.

3.2.4 18 Monate

Bei der 18-Monate-Standzeit zeigt sich wieder eine Zunahme der Resorption bei drei von fünf Proben im Vergleich zur Sechs-Monate-Standzeit. Diese drei Proben zeigen eine ähnlich fortgeschrittene Resorption, wie sie bei der Drei-Monats-Gruppe makroskopisch zu beobachten war. Bei diesen drei Implantaten können im Randbereich auch Fragmentierungsvorgänge beobachtet werden. Bei einer Probe ziehen makroskopisch auch Gewebestraßen ins Innere des Implantats, erreichen es aber nicht und durchziehen das gesamte Implantat auch nicht, wie es bei einer Probe aus der drei Monate Gruppe zu beobachten war (Abbildung 30).

Im Vergleich zu den 1P-CPC Proben von sechs Monaten weisen die anderen zwei 1P-CPC Proben von 18 Monaten eher eine verminderte Resorption auf.

Die knöcherne Integration ist bei allen 18-Monats-Proben von 1P-CPC stark ausgeprägt, vergleichbar mit der von sechs Monaten.

1P-CPC

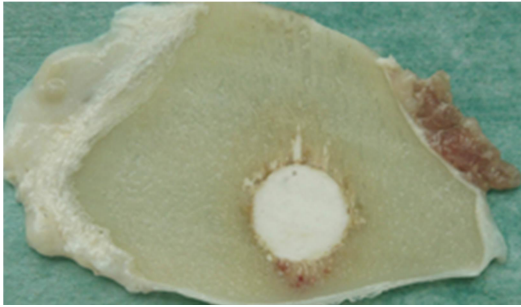


Abbildung 26: 1 Monat (Sf 11 li Ti)



Abbildung 27: 3 Monate (Sf 13 re Fe)



Abbildung 28: 6 Monate (Sf 7 re Fe)



Abbildung 29: 6 Monate (Sf 19 li Fe)



Abbildung 30: 18 Monate (Sf 9 li Fe)

3.2.5 *Mikroskopische Beurteilung*

Nach einem Monat Standzeit finden sich bereits viele Osteoblasten und Osteozyten sowie zahlreiche ein- und mehrkernige Makrophagen am Interface. (Abbildung 31, Abbildung 32) Dies ist als Zeichen einer moderaten Resorption zu werten. Erst in den Proben mit der Standzeit von drei Monaten nimmt die Resorption stark zu. Ab sechs Monaten ist dagegen kaum noch eine Zunahme zu beobachten. Es kommt zur Stagnation der Resorption. Jedoch ist bei den Proben mit der Standzeit von sechs und 18 Monaten Knochengewebe ins Implantat vorgedrungen, als Zeichen einer noch stattfindenden Resorption. Ebenso kann gelbes Knochenmark im Implantat festgestellt werden.

Fragmentierungen, die bis ins Innere des Implantats reichen, waren auch histologisch nur bei einer 3-Monats-Probe zu finden. Diese zeigt Gewebestraßen, welche noch aktiv sind und durch das 1P-CPC Implantat ziehen. Ein Zeichen für die Aktivität sind aktive Osteoblasten, die noch zu Osteozyten umgewandelt werden müssen. Gesäumt werden diese unvollendeten Gewebestraßen von mehrkernigen Makrophagen (Abbildung 33, Abbildung 34).

Die knöcherne Integration nimmt im Verlauf der Standzeiten zu. Mikroskopisches Zeichen hierfür ist die Umwandlung von Granulationsgewebe am Interface zu neu gebildeten Knochentrabekel. Die Knochentrabekel sind verdichtet, mineralisiert und weisen einen relativ breiten Saum von Osteoid auf. In den späteren Standzeiten sind kaum noch aktive Osteoblasten bzw. Makrophagen am Interface zu finden. Ein fester Verbund zwischen Implantat und neu gebildetem Knochengewebe ist nach 18 Monaten entstanden (Abbildung 35). Die Vermutung besteht, dass je weniger Resorptionsvorgänge am Randbereich der Implantate zu finden sind, desto besser die knöcherne Integration ausgebildet ist.

Es konnte bei keiner Probe des 1P-CPC Implantats Abstoßungsreaktionen beobachtet werden.

1P-CPC:

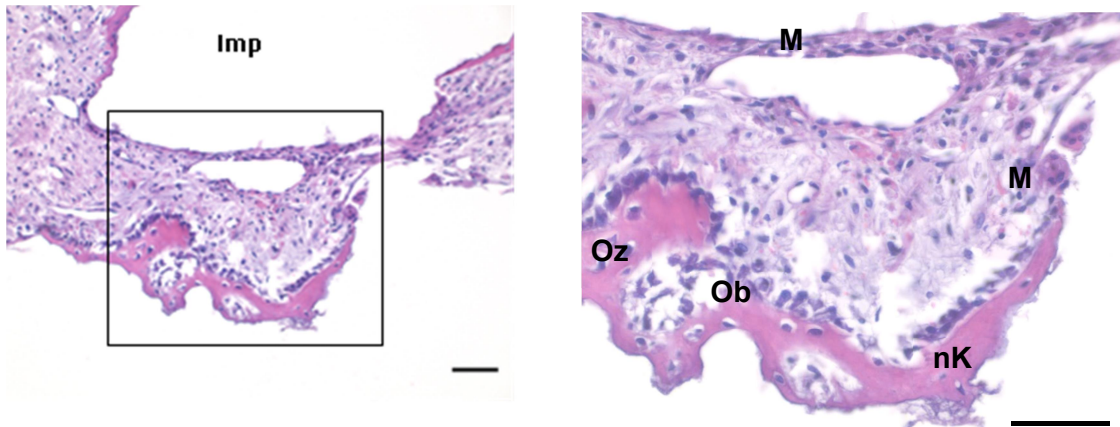


Abbildung 31 rechts: 1 Monat (Sf 11 li Ti) Maßstab 100 µm & Abbildung 32 links: Maßstab 50 µm
An einigen Stellen des Interfaces wird neu gebildetes Knochengewebe (nK) mit Osteoblasten (Ob) und Osteozyten (Oz) nachgewiesen. Direkt im Anschluss an das Knochengewebe haben sich mehrkernige Makrophagen (M) angesiedelt. Imp: Implantat.

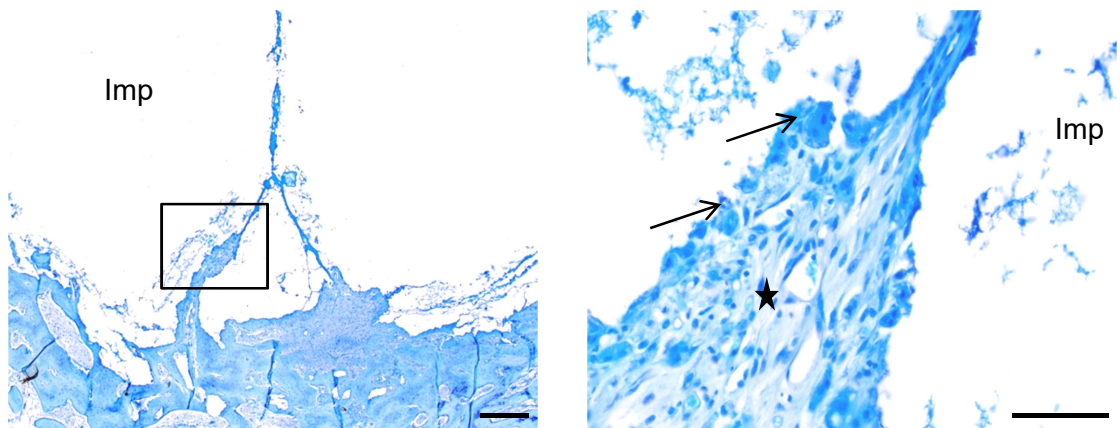


Abbildung 33 rechts: 3 Monate (Sf 13 re Fe) Maßstab: 100 µm & Abbildung 34 links: Maßstab 50 µm
Das in das Implantat (Imp) einwachsende Gewebe (Stern) wird von mehrkernigen Makrophagen (Pfeil) gesäumt.

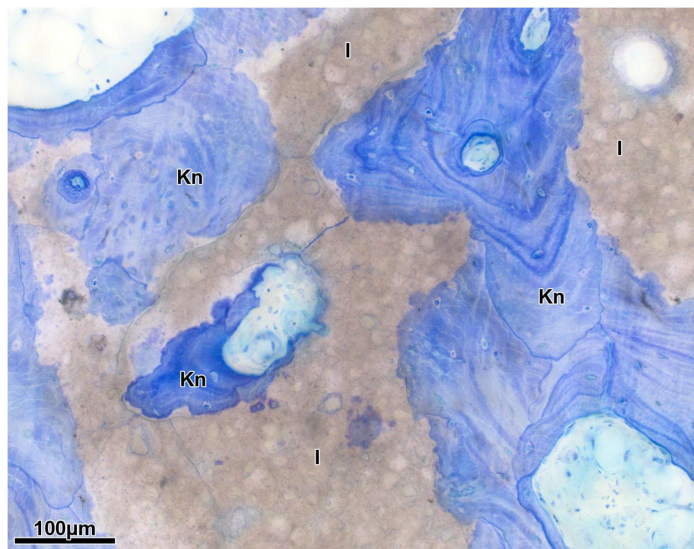


Abbildung 35: 18 Monate (Sf 6 li Fe) Maßstab 100 µm
Einige Knochentrabekel (Kn) sind in das Implantat (I) hinein gewachsen.

3.3 Eisenschaum ohne Zement

Im Folgenden werden die makroskopischen Ergebnisse vom Eisenschaum-Implantat ohne Zementfüllung der einzelnen Standzeiten nach einem, drei, sechs und 18 Monaten aufgeführt. Dabei wurde jeweils nur die Knochenscheibe 3 beurteilt.

Eine zusammenfassende mikroskopische Beurteilung über alle vier Standzeiten bildet den Abschluss.

Bei den einzelnen Standzeiten stand eine unterschiedliche Anzahl von Proben des Eisenschaum-Implantats zur Auswertung zur Verfügung. Für einen Monat waren es drei Proben, für drei, sechs und 18 Monate waren es vier Proben.

3.3.1 Ein Monat

In der makroskopischen Beurteilung ist der Eisenfestkörper im Bohrloch zu erkennen. Es scheinen keine Abbauprozesse am Implantat stattgefunden zu haben, allerdings ist eine Korrosion des Eisens am Randbereich zu erkennen, welche sich als bräunliche Verfärbung des Randgewebes darstellt. Vereinzelt sind die Randporen mit Gewebe gefüllt. Das gesamte Implantat oder Teile dessen werden durch ein weiches helles Gewebe vom umliegenden Knochentrabekelwerk abgegrenzt (Abbildung 36). Dieses Gewebe war beim 1P-CPC Implantat nicht zu erkennen. Die knöcherne Integration scheint durch dieses schaumige Gewebe gemindert zu werden.

3.3.2 Drei Monate

Im Vergleich zum Resorptionsverhalten nach einem Monat zeigten sich auch bei drei Monaten Standzeit keine Resorptionszeichen am Implantat. Es ist noch vollständig erhalten (Abbildung 37). Teilweise ist mehr Gewebe ins Implantat vorgedrungen als bei der vorherigen Standzeit. Die knöcherne Integration ist im Vergleich zur früheren Standzeit fortgeschritten. Stellenweise ist makroskopisch bereits neuer Knochen in den Randporen zu sehen.

3.3.3 Sechs Monate

Die knöcherne Erschließung und Fragmentierung schreitet weiter fort. Makroskopisch ist helles und weiches Gewebe bis in die inneren Poren des Eisenschaum-Implantats vorgedrungen. Auch die knöcherne Integration ist weiter fortgeschritten. Am Interface ist makroskopisch kein weiches Gewebe mehr zu beobachten. Das Implantat liegt direkt am Knochen an. Der Knochen erscheint auch fester im Vergleich zu den früheren Standzeiten, ähnlich dem Knochentrabekelwerk, welches das 1P-CPC Implantat umgibt (Abbildung 38). Stellenweise sind die Randporen des Implantats bereits mit Knochen gefüllt.

3.3.4 18 Monate

18 Monate nach erfolgter Implantateinbringung sind ca. 70% der interkonnektierenden Poren gefüllt. Somit ist die knöcherne Erschließung weiter fortgeschritten als beim 1P-CPC Implantat nach 18 Monaten. Jedoch ist die Fragmentierung beim 1P-CPC Implantat nach 18 Monaten weiter vorangeschritten, im Vergleich zur 18 Monate Standzeit vom Eisenschaum. Eine Probe weist gelbliches Gewebe im Randbereich auf. Es könnte sich um Knochenmark handeln als Zeichen des Remodelings. Am Interface zeigt sich im Vergleich zu Sechs-Monats-Proben mehr Granulationsgewebe (Abbildung 39). Somit lässt sich vermuten, dass die knöcherne Integration lockerer ist als bei den Sechs-Monats-Proben. Makroskopisch ist auch weniger Knochen in den Randporen zu erkennen. Die Korrosion ist genauso stark ausgeprägt wie bei den Ein-Monats-Proben.

Eisenschaum ohne Zement

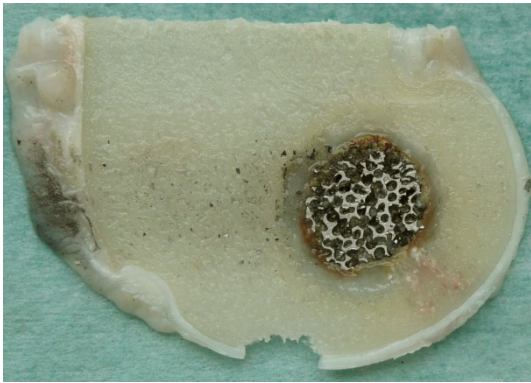


Abbildung 36: 1 Monat (Sf 11 re Fe)

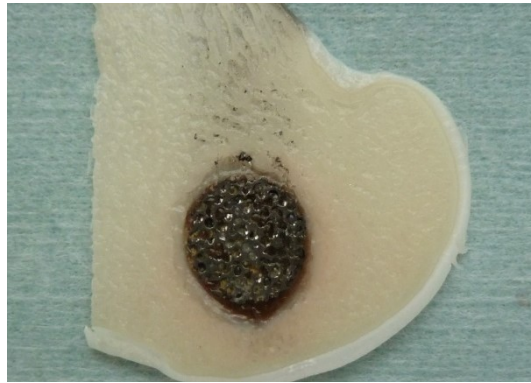


Abbildung 37: 3 Monate (Sf 21 re Fe)

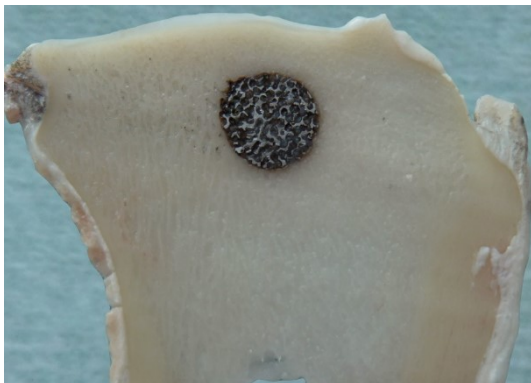


Abbildung 38: 6 Monat (Sf 19 li Ti)

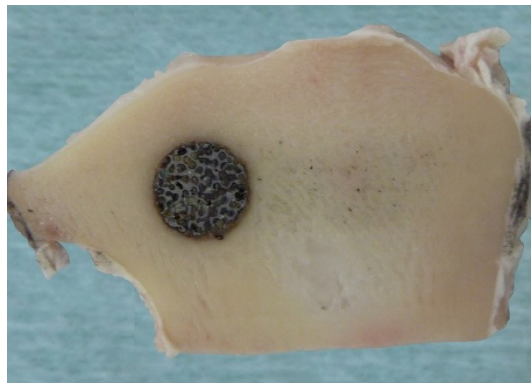


Abbildung 39: 18 Monate (Sf 23 li Ti)

3.3.5 Mikroskopische Beurteilung

In allen Proben der vier Standzeiten sind neu gebildete Blutgefäße im Granulationsgewebe am Interface und in den interkonnektierenden Poren zu beobachten (Abbildung 41). In direkter Nähe der neu gebildeten Gefäße liegen sehr große Makrophagen mit vesikelreichem Zytoplasma. Eisenfragmente liegen im Granulationsgewebe des Interfaces. Um diese Fragmente sind zahlreiche Zellen lokalisiert, welche Einschlüsse enthalten, bei denen es sich um Abbauprodukte des Implantats handeln könnte (Abbildung 40). Die Fragmentierung bzw. die Erschließung der interkonnektierenden Poren ist mikroskopisch postoperativ nach einem Monat schon moderat fortgeschritten und somit im Vergleich zu 1P-CPC weiter ausgebildet. Auch die Resorption ist weiter vorangeschritten als im Vergleich zu 1P-CPC nach einem Monat. Die Fragmentierung nimmt im Laufe der Standzeiten weiter zu.

Makrophagen sitzen direkt am Implantat und umgeben es kreisförmig (Abbildung 42). Diese mehrkernigen Makrophagen scheinen das Implantat abzubauen, in großen Vakuolen die Abbauprodukte zu speichern und mit ihnen ins Granulationsgewebe zu wandern.

Die knöcherne Integration ist im Vergleich zu den 1P-CPC Implantaten schlechter.

Auch in der mikroskopischen Beobachtung sind in allen Proben der Standzeiten Zellen am Interface zu erkennen, die eine rötlich/braune Färbung aufweisen (Abbildung 44). Es wird vermutet, dass dies ein Zeichen der Erosion am Implantat ist.

Bei einer Probe mit einem Eisenschaum-Implantat wurden nach einer Standzeit von einem Monat vereinzelt immunkompetente Zellen gefunden (Abbildung 43).

Eisenschaum ohne Zement:

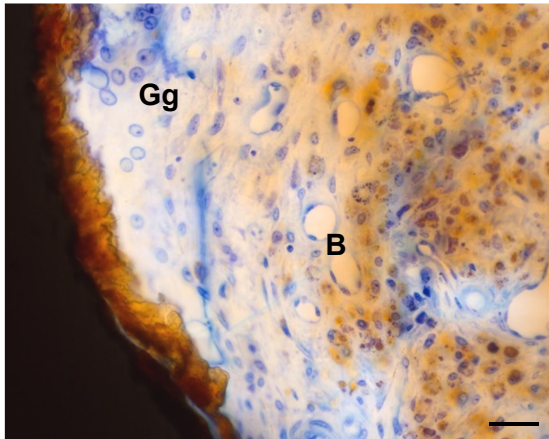


Abbildung 41: 3 Monate (Sf 13 re Ti) Maßstab 50 µm

Im Granulationsgewebe (Gg) befinden sich neu gebildete Gefäße (B).

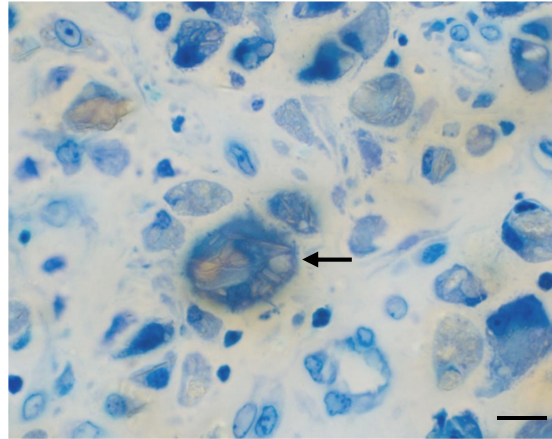


Abbildung 40: 1 Monat (Sf 8 li Fe) Maßstab 10 µm

Zellen mit Eiseneinschlüssen

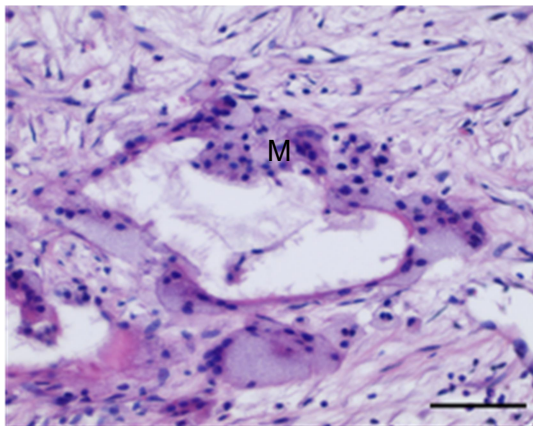


Abbildung 42: 1 Monat (Sf 11 re Fe) Maßstab 50 µm

Im Granulationsgewebe sind Ansammlungen von mehrkernigen Makrophagen (M) zu finden, die einen Hohlraum umschließen, in dem vermutlich resorbierbare Fragmente des Implantates abgebaut werden.

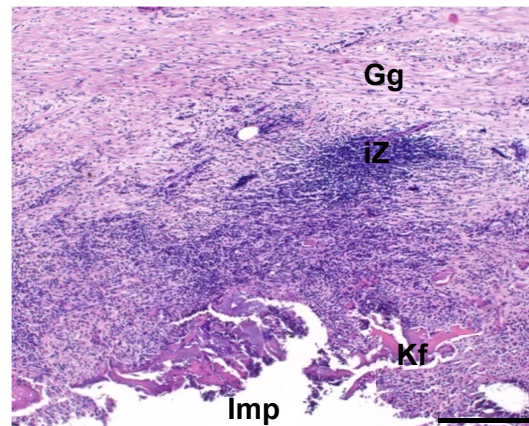


Abbildung 43: 1 Monat (Sf 11 re Fe) Maßstab 100 µm

Im Granulationsgewebe (Gg) befinden sich einzelne Knochenfragmente (Kf), an denen Osteoklasten zu finden sind, sowie gelegentlich Ansammlungen immunkompetenter Zellen (iZ).

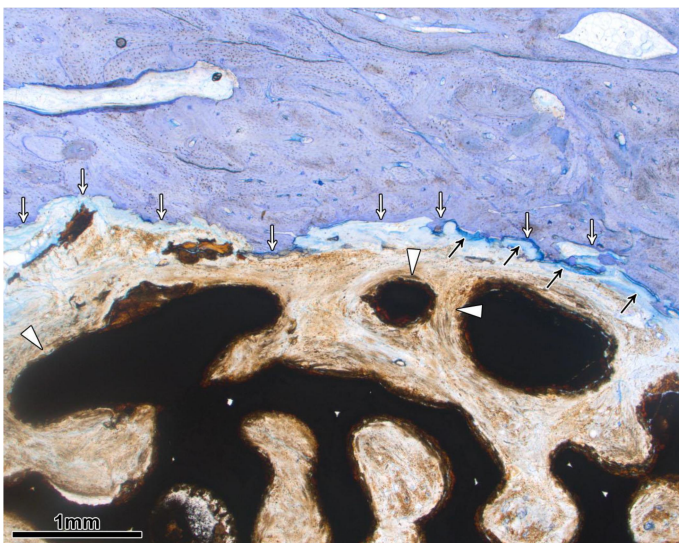


Abbildung 44: 18 Monate (Sf 23 li Ti) Maßstab 1 mm

Die unregelmäßige Knochenlinie (weiße Pfeile) des Lagerknochens lässt auf Abbauvorgänge an dieser Stelle schließen, die aufgrund des Fehlens knochenabbauender Zellen abgeschlossen scheinen. Dezentrierte Osteoidsäume zeugen von einem sukzessiven Auffüllen der Knochenlakunen (schwarzer Pfeil). Zwischen den Stegen des Metallschaumes liegen die braun verfärbten bindegewebigen Fasern oft zirkulär um das Material herum ausgerichtet (Pfeilköpfe).

3.4 Eisenschaum-CPC

Im Folgenden werden die makroskopischen Ergebnisse vom Eisenschaum-CPC Implantat der einzelnen Standzeiten nach einem, drei, sechs und 18 Monaten aufgeführt. Dabei wurde jeweils nur die Knochenscheibe 3 beurteilt und eine zusammenfassende mikroskopische Beurteilung über die vier Standzeiten abgeben.

Bei den einzelnen Standzeiten stand eine unterschiedliche Anzahl von Proben des Eisenschaum-CPC-Implantats zur Auswertung zur Verfügung. Für einen, drei und sechs Monate waren es vier Proben. Für 18 Monate waren es nur zwei Proben.

3.4.1 Ein Monat

Das Eisenschaum-CPC-Implantat liegt unverändert im Bohrloch. Es zeigt makroskopisch keine Spuren von Resorption oder Fragmentierung bzw. Einwachsverhalten von Gewebe. Zwischen Knochen und Implantat hat sich, wie bereits bei Eisenschaum zu beobachten war, ein schaumiges weiches helles Gewebe angesammelt. Im Unterschied zum Eisenschaum-Implantat ist dieses Gewebe beim Eisenschaum-CPC-Implantat stellenweise mit Knochentrabekeln durchzogen (Abbildung 45). Es ist nicht mit einem einheitlichen Ring wie beim Eisenschaum-Implantat zu vergleichen. Erosionsprozesse sind makroskopisch nicht zu erkennen.

3.4.2 Drei Monate

Das Implantat liegt wie bei der Ein-Monat-Standzeit genauso unverändert vor. Im Vergleich zu einem Monat hat das Gewebe zwischen Knochentrabekelwerk und Implantat abgenommen. Jetzt sind auch Erosionsvorgänge zu beobachten, allerdings nur an den Stellen, an denen das Eisen offen liegt und nicht vom Calcium-Phosphat-Zement umgeben ist (Abbildung 46).

3.4.3 Sechs Monate

Auch nach sechs Monaten postoperativer Standzeit zeigen sich makroskopisch keine Veränderungen am Implantat (Abbildung 47). Lediglich die knöcherne Integration hat sich verstärkt. Der Saum aus hellem weichem Gewebe am Interface ist im Vergleich zur Drei-Monats-Gruppe weniger geworden. Das umliegende Knochengewebe erscheint stabiler. Erosionsprodukte finden sich nur noch vereinzelt.

3.4.4 18 Monate

Bei einem Implantat scheint der Calcium-Phosphat-Zement aus den Randporen des Implantats resorbiert zu sein und die Poren mit Knochen gefüllt (Abbildung 48). Jedoch ist dies bei dem anderen Eisenschaum-CPC Implantat dieser Standzeit nicht zu beobachten. Dort liegt das Implantat unverändert vor (Abbildung 49). Bei beiden

Implantaten der 18 Monate Standzeit ist, wie bereits nach sechs Monaten postoperativer Standzeit, erneut eine Stabilisierung des umliegenden Knochens zu beobachten. Fragmentierungsprozesse haben auch nach 18 Monaten nicht stattgefunden.

Eisenschaum-CPC

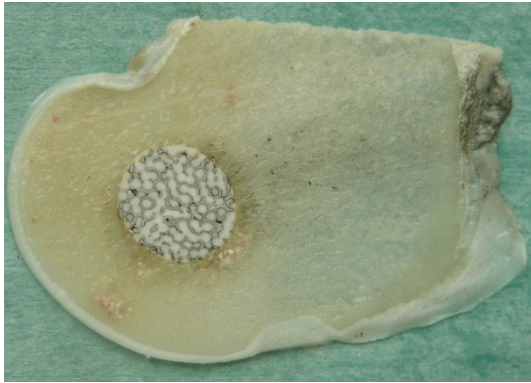


Abbildung 45: 1 Monat (Sf 11 li Fe)

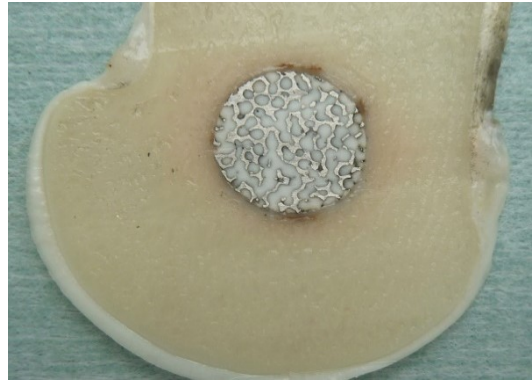


Abbildung 46: 3 Monate (Sf 21 li Fe)

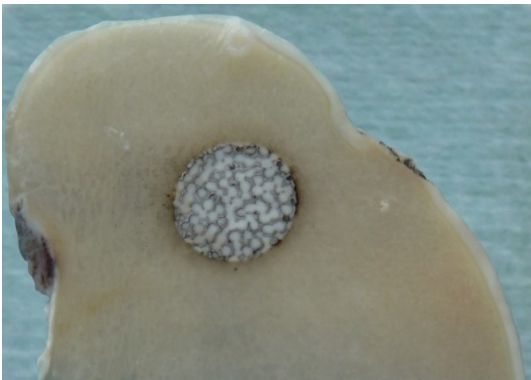


Abbildung 47: 6 Monate (Sf 5 re Fe)

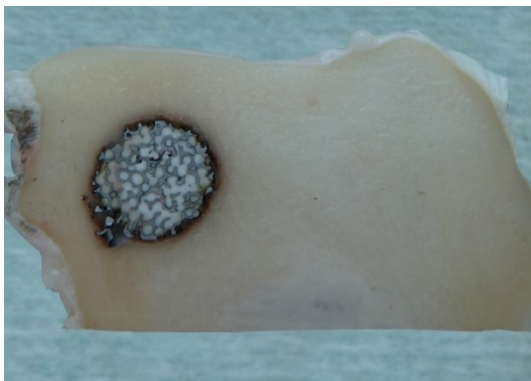


Abbildung 48: 18 Monate (Sf 6 li Ti)



Abbildung 49: 18 Monate (Sf 15 re Fe)

3.4.5 Mikroskopische Beurteilung

Am Interface zeigt sich bereits nach einem Monat neu gebildetes Knochengewebe, das bis an das Implantat heranreicht und in dem bereits frische Osteozyten eingemauert sind (Abbildung 50). Die knöcherne Integration ist somit beim Eisenschaum-CPC, genau wie bei 1P-CPC, moderat fortgeschritten, jedoch stärker als bei Eisenschaum ohne Calcium-Phosphat-Zement Füllung. Neu aussprossende Gefäße liegen im Granulationsgewebe, welches sich am Interface ebenfalls gebildet hat (Abbildung 51). Im Verlauf der Standzeiten nehmen das Granulationsgewebe am Interface ab und die knöcherne Integration zu. Vom Lagerknochen ausgehend findet eine dezente Knochenneubildung nach einem Monat Standzeit am Randbereich des Implantats statt (Abbildung 52). Diese Knochenneubildung nimmt bei drei Monaten zu (Abbildung 53). Neben neuem Geflechtknochen haben sich nach 18 Monaten mit direktem Kontakt zum Implantat breite Osteoidensäume gebildet (Abbildung 54). Das Osteoid hat sowohl Kontakt zur metallischen Komponente als auch zum Zement des Implantats.

Die interkonnektierenden Poren sind vollständig mit Calcium-Phosphat-Zement gefüllt. Auch nach 18 Monaten sind nur am Randbereich dezente Resorptionsvorgänge durch Erosionslakunen in den Randbereichen des Implantats zu beobachten. Im Vergleich zu den anderen Implantat-Typen liegt beim Eisenschaum-CPC die geringste Resorption über die gesamte Versuchszeit vor. Sehr große Makrophagen sind im Vergleich zu anderen Implantaten am Interface bei einer postoperativen Standzeit von sechs Monaten zu finden.

Am Randbereich des Eisenschaumes, welcher nicht von Calcium-Phosphat-Zement umgeben ist und somit Kontakt zum umliegenden Gewebe hat, bilden sich nach drei Monaten Eisenabbauprodukte, bei denen es sich vermutlich um Oxidationsprodukte handelt. An ihrer Oberfläche befinden sich mehrkernige Makrophagen, die Phagozytose ausüben. Dieselben Prozesse sind auch bei den 18-Monats-Proben zu erkennen.

Immunpositive Zellen waren an keiner Probe des Eisenschaum-CPC Implantats zu beobachten.

Eisenschäum-CPC

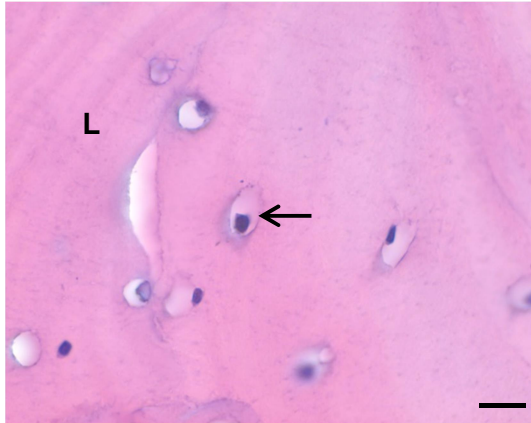


Abbildung 50: 1 Monat (Sf 17 re Ti) Maßstab 10 µm

Im Knochengewebe befinden sich viele frisch eingemauerte Osteozyten (Pfeil). Teile des Knochens sind bereits in Lamellenknochen (L) umgebaut.

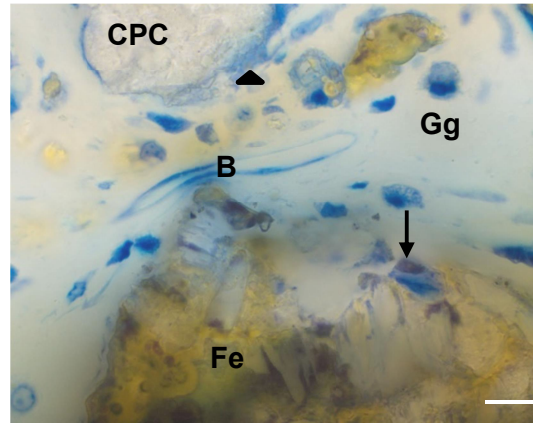


Abbildung 51: 1 Monat (Sf 8 re Ti) Maßstab 10 µm

An den CPC-Fragmenten (CPC) werden mehrkernige Makrophagen lokalisiert (Pfeilkopf). Im Granulationsgewebe (Gg) befinden sich neu aussprossende Gefäße (B). An den Eisen-Implantat-Fragmenten (Fe) befinden sich einkernige Makrophagen (Pfeil).

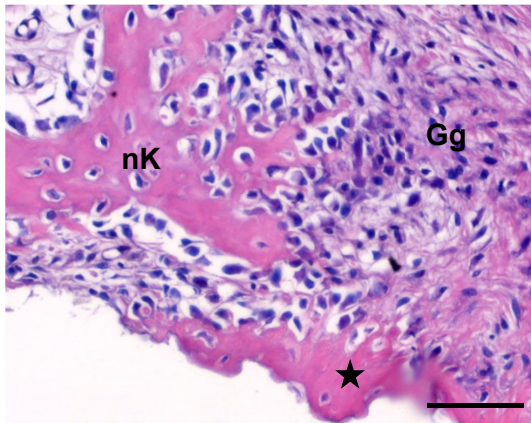


Abbildung 52: 1 Monat (Sf 20 re Fe) Maßstab 50 µm

Im Granulationsgewebe (Gg) eingelagert befindet sich neu gebildeter Knochen (nK). Teilweise wird direkt am Implantat neues Knochengewebe nachgewiesen (Stern).

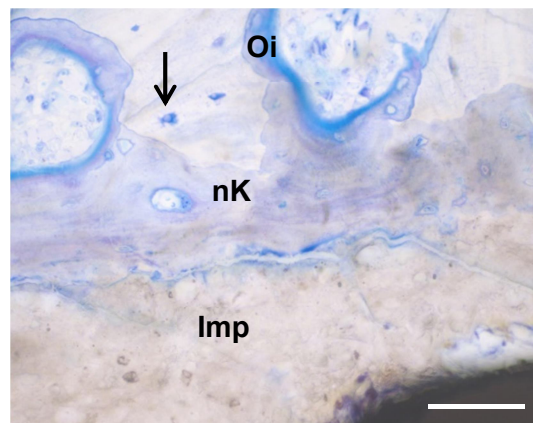


Abbildung 53: 3 Monate (Sf 12 re Ti) Maßstab 50 µm

Direkt an das Implantat (Imp) grenzt neu gebildetes Knochengewebe (nK). Oi: Osteoid, Pfeil: Osteozyten.

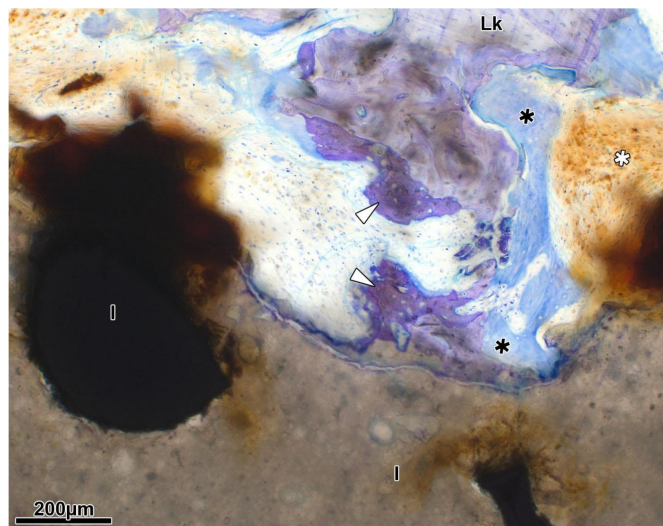


Abbildung 54: 18 Monate (Sf 6 li Ti) Maßstab 200 µm

Vom Lagerknochen (Lk) ausgehend findet eine dezente Knochenneubildung in Richtung auf das Implantat (I) statt. Neben dem Geflechtknochen (Pfeilspitze) fallen breite Osteoidsäume (dunkler Stern) auf. Rostbraun gefärbte Zellen (weißer Stern)

3.5 2P-CPC-Aspirat

Im Folgenden werden die makroskopischen Ergebnisse vom 2P-CPC-Aspirat-Implantat der einzelnen Standzeiten nach einem, drei, sechs und 18 Monaten aufgeführt. Dabei wurde jeweils nur die Knochenscheibe 3 beurteilt. Eine zusammenfassende mikroskopische Beurteilung über alle vier Standzeiten findet sich im Anschluss.

Bei den einzelnen Standzeiten stand eine unterschiedliche Anzahl von Proben des 2P-CPC-Aspirat-Implantats zur Auswertung zur Verfügung. Für einen Monat waren es vier Proben, für drei Monate waren es drei Proben, für sechs Monate waren es wieder vier Proben und fünf Proben bei 18 Monaten.

3.5.1 Ein Monat

Bereits nach einem Monat ist eine moderate Resorption am 2P-CPC-Aspirat-Implantat zu erkennen. Bei einer von vier Proben sind Gewebestraßen bis ins Innere des Implantats vorgedrungen und haben es in mehrere Fragmente geteilt. Im Inneren dieser Teilung ist ein gelbliches Gewebe makroskopisch zu beobachten (Abbildung 55). Es könnte sich um Fibrin handeln. Bei den restlichen drei Implantaten der Standzeit ist eine Fragmentierung am Randbereich zu erkennen. Alle Proben werden von einem hellen weichen Gewebe umgeben, das mit Knochengewebe durchzogen ist. Genauso ist es bei den Proben des Eisenschaum-CPC-Implantats zu beobachten. Insgesamt ist dieses Gewebe weniger stark vertreten als bei Eisenschaum. Wie bereits beim 1P-CPC-Implantat ist auch beim 2P-CPC-Aspirat-Implantat zu beobachten, dass der flüssige Zement bei der Einbringung in die angrenzenden Knochentrabekel eingedrungen ist.

3.5.2 Drei Monate

Zwei der drei Proben weisen eine deutliche Zunahme der Fragmentierung auf. Gewebestraßen ziehen bei diesen Proben bis in die Mitte des Implantats. Bei einer Probe ist die Gewebestraße schon viermal so breit wie die Gewebestraßen, welche bei 1P-CPC nach drei Monaten zu beobachten waren (Abbildung 56).

Das schaumige Gewebe am Interface ist im Vergleich zur Ein-Monats-Gruppe reduziert. Knochentrabekel haben sich stellenweise zwischen Implantat und Implantatabspaltungen gebildet.

3.5.3 Sechs Monate

Drei Proben wiesen nur wenig Resorptionsverhalten am Randbereich auf – sogar noch weniger, als bei der 3-Monate-Standzeit zu beobachten war (Abbildung 57). Eine Probe dagegen war vollständig von Gewebestraßen durchzogen und in viele kleine Fragmente zerlegt. Zwischen den Fragmenten zeigte sich gelbes Gewebe im Inneren

des Implantats. An alle 2P-CPC-Aspirat-Implantate reichten die Knochentrabekel bis an das Implantat heran. Das helle weiche Gewebe im Interface hat sich im Vergleich zur 3-Monate-Standzeit noch einmal verringert.

3.5.4 18 Monate

Die Proben der 18-Monate-Standzeit weisen sehr große Schwankungen auf. Zwei Proben zeigten nur am Randbereich leichte Resorptionsprozesse, welche mit denen der Ein-Monat-Gruppe vergleichbar sind (Abbildung 58). Zwei Proben dagegen sind komplett fragmentiert und in noch kleinere Teile zerlegt (Abbildung 59). Derselbe Prozess ist bereits bei einer Probe aus sechs Monaten Standzeit zu beobachten. Eine Probe des 2P-CPC-Aspirat-Implantats weist in den oberen Schichten eine starke Fragmentierung auf, jedoch nicht in Knochenscheibe 3, welche nur zur besseren Vergleichbarkeit der makroskopischen Ergebnisse beurteilt wurde. Bei allen fünf Proben lag der Knochen direkt am Implantat an. Am Interface ist kein helles Gewebe mehr zu erkennen.

2P-CPC-Aspirat

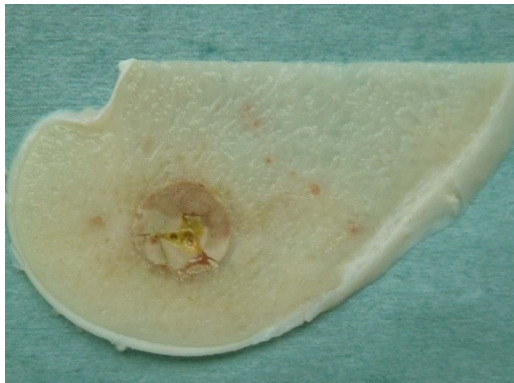


Abbildung 55: 1 Monat (Sf 20 li Fe)



Abbildung 56: 3 Monate (Sf 10 li Fe)



Abbildung 57: 6 Monate (Sf 5 li Fe)

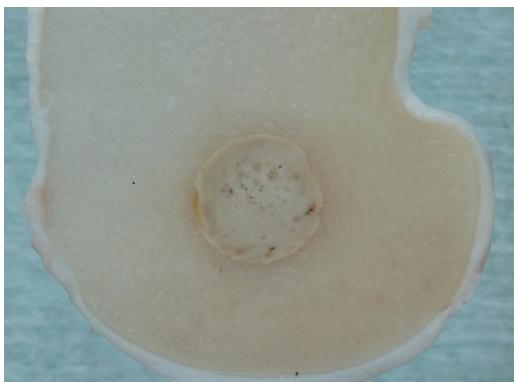


Abbildung 58: 18 Monate (Sf 24 re Fe)

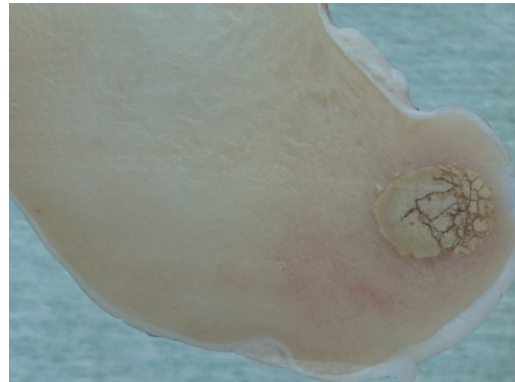


Abbildung 59: 18 Monate (Sf 15 li Fe)

3.5.5 *Mikroskopische Beurteilung*

Die Knochenneubildung scheint vom Lagerknochen auszugehen und in kreisförmigen Strukturen abzulaufen. Im Inneren der kreisförmigen Strukturen befinden sich Erosionslakunen. Die Osteoblasten sind dabei an der materialabgewandten Seite lokalisiert. Zwischen verdichtetem Lagerknochen und Implantat befindet sich Granulationsgewebe mit vielen neuen Blutgefäßen. Das neu gebildete Knochengewebe mit Osteoblasten, Osteozyten und mehrkernigen Makrophagen unterbricht stellenweise das Granulationsgewebe. Im Laufe der Standzeiten nimmt das Granulationsgewebe am Interface ab und wird durch neu gebildeten Knochen ersetzt. Eine Fragmentierung, ausgehend vom Interface, ist bei allen Standzeiten mal mehr und mal weniger stark ausgeprägt zu erkennen. Erosionslakunen mit Granulationsgewebe finden sich im Implantat und durchziehen es. Dadurch entstehen Straßen aus Granulationsgewebe im Implantat, welche im Laufe der Standzeiten auch zu Knochengewebsstraßen umgewandelt werden (Abbildung 60). Die Makrophagen im Granulationsgewebe bei der Ein-Monats-Gruppe weisen im Vergleich zu anderen Implantaten weniger Kerne auf. Viele mehrkernige Makrophagen, mit teilweise sehr vielen Kernen, sind am Interface erst ab der 3-Monats-Standzeit zu finden (Abbildung 61). Teilweise durch Resorption und zum Teil durch die Materialbeschaffenheit entstehen Hohlräume im Implantat, welche mit gelbem Knochenmark gefüllt sind. Daran schließen sich neu gebildete Knochentrabekel an. Auch beim 2P-CPC-Aspirat-Implantat nimmt die knöcherne Integration im Laufe der Standzeiten zu, was daran zu erkennen ist, dass nach 18 Monaten sich das Interface durch eine starke Verbindung zwischen Lagerknochen und Implantat auszeichnet. Diese Verbindung ist gekennzeichnet durch das Einwachsen von Lagerknochen, bestehend aus einem Osteoidsaum, in das Implantat (Abbildung 62). Auch beim 2P-CPC-Aspirat-Implantat gibt es nur eine Probe aus der drei Monate Standzeit und eine bei einem Monat Standzeit, bei der sehr vereinzelt Ansammlungen von immunkompetenten Zellen zu beobachten sind.

2P-CPC-Aspirat

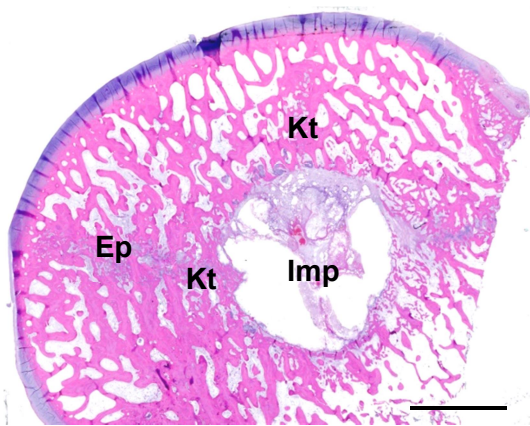


Abbildung 60: 1 Monat (Sf 20 li Fe) Maßstab 1 cm

Im Paraffinschnitt ist gut zu erkennen, dass das Implantat (Imp) von Gewebe durchwachsen und fragmentiert wurde. Die Knochen trabekel (Kt) um das Implantat sind verdichtet. Ep: Epiphysenfuge.

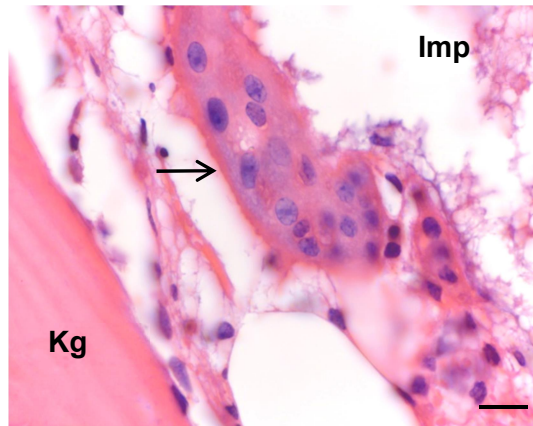


Abbildung 61: 3 Monate (Sf 10 li Fe) Maßstab 10 µm

Am Interface des Implantats (Imp) werden viele mehrkernige Makrophagen (Pfeil) gefunden, die teilweise sehr viele Kerne aufweisen.

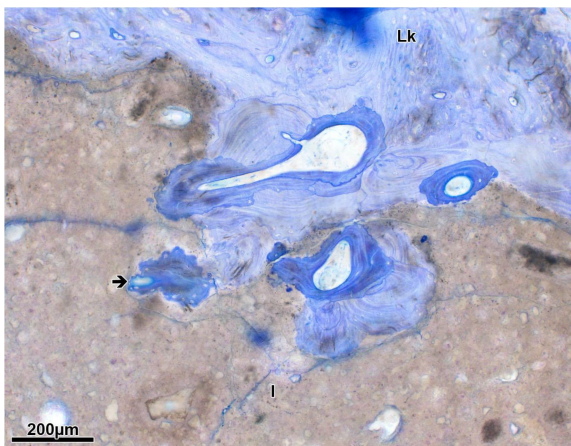


Abbildung 62: 18 Monate (Sf 24 re Fe) Maßstab 200 µm

Der Interfacebereich ist durch eine dichte Verbindung zwischen Lagerknochen (Lk) und Implantat (I) gekennzeichnet. Die graduellen Farbunterschiede im Lamellenknochen zeugen von unterschiedlich alten Knochenabschnitten, wobei die kräftiger gefärbten Anteile in der Peripherie des Implantats jüngerem Knochen entsprechen. Moderate Osteoidsäume (Pfeil) geben Hinweise auf ein dezentes Knochenwachstum in das Material hinein.

3.6 Mg-CPC

Im Folgenden werden die makroskopischen Ergebnisse vom Mg-CPC-Implantat der einzelnen Standzeiten nach einem, drei, sechs und 18 Monaten aufgeführt. Dabei wurde jeweils nur die Knochenscheibe 3 beurteilt. Eine zusammenfassende mikroskopische Beurteilung über die vier Standzeiten befindet sich am Ende des Kapitels.

Bei den einzelnen Standzeiten stand eine unterschiedliche Anzahl von Proben des Mg-CPC-Implantats zur Auswertung zur Verfügung. Für einen Monat gab es drei Proben. Für die restlichen Standzeiten (drei, sechs und 18 Monate) waren jeweils vier Proben vorhanden.

3.6.1 *Ein Monat*

Zirkulär um das Implantat herum hat sich wieder, wie bereits schon bei den beiden Eisenschaum-Implantaten und auch bei dem 2P-CPC-Implantat, eine Schicht aus hellem schwammig wirkendem Gewebe gesammelt. Im Vergleich zum Eisenschaum und Eisenschaum-CPC hat sich mehr von diesem Gewebe angesammelt. Somit ist auch die knöcherne Integration nur leicht vorangeschritten. Eine leichte Resorption und Fragmentierung hat im Randbereich stattgefunden. Bei einer Probe ist bei den tieferen Knochenscheiben das Bohrloch fast vollständig mit hellem weichem Gewebe gefüllt und nur zentral liegt noch Implantatmaterial vor (Abbildung 63). In den oberen Schnitten ist das Implantat noch vollständig erhalten.

3.6.2 *Drei Monate*

Auch bei der Drei-Monate-Standzeit-Gruppe ist ein stark ausgeprägter Ring aus hellem weichem Gewebe um das Implantat herum, am Interface, zu erkennen (Abbildung 64). Im Vergleich zu den anderen Implantat-Typen war hier das meiste helle weiche Gewebe festzustellen. Im Unterschied zu den anderen Implantat-Typen scheint dieses helle weiche Gewebe mit Mg-CPC-Implantat-Teilen durchmischt zu sein. Es sieht nicht homogen hell gefärbt aus, wie es beim Eisenschaum zu beobachten ist, sondern weist hellere Streifen auf, die aber auch nicht wie Knochen aussehen, so wie es bei Eisenschaum-CPC und 2P-CPC-Aspirat der Fall war. Bei einer Probe hat sich am Rand ein Ring vom Implantat-Material abgespalten. (Abbildung 65) Dies wird als beginnende Fragmentierung gewertet. Im Vergleich zur Ein-Monats-Gruppe hat die Resorption im Randbereich zugenommen.

3.6.3 *Sechs Monate*

Das Implantat scheint von außen nach innen abgebaut zu werden. Makroskopisch sieht es so aus, als ob das Mg-CPC-Implantat für die Resorption nicht fragmentiert

wird, sondern kreisrund von außen nach innen umgewandelt wird. Auch bei sechs Monaten hat es den Anschein, dass das Gewebe am Interface aus herkömmlichem Granulationsgewebe und Resten vom Implantat besteht. Bei einer Probe sind in allen Schnitten nur noch ganz zentral Reste vom Implantat erhalten (Abbildung 66). Der restliche Bohrlochraum ist mit einer Mischung aus Granulationsgewebe und Resten von Implantat-Material gefüllt.

3.6.4 18 Monate

Weißliches Gewebe, welches dieselbe Färbung wie Fett hat, ist zentral bei zwei Proben zu erkennen. Das restliche Bohrloch ist mit Knochen gefüllt (Abbildung 67). Bei einer von vier Proben sind nur noch zentral partiell Reste des Mg-CPC-Implantats zu erkennen. Das restliche Bohrloch ist ebenfalls mit Knochentrabekeln gefüllt. Bei einer Probe ist sogar das gesamte Bohrloch mit Knochengewebe gefüllt und nur in Schichten, die näher am Gelenkspalt liegen, sind zentral noch Implantat-Reste zu erkennen (Abbildung 68).

Mg-CPC

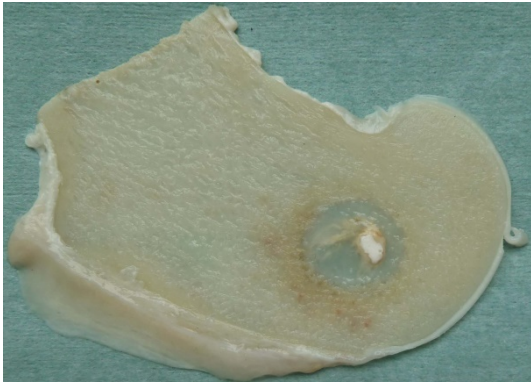


Abbildung 63: 1 Monat (Sf 17 re Fe)

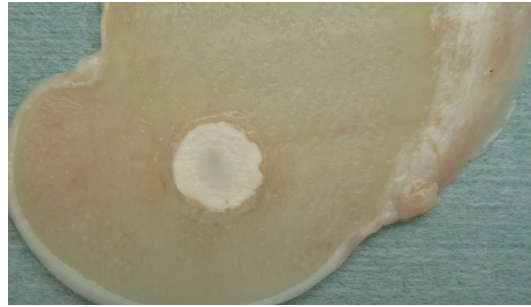


Abbildung 64: 3 Monate (Sf 13 li Fe)

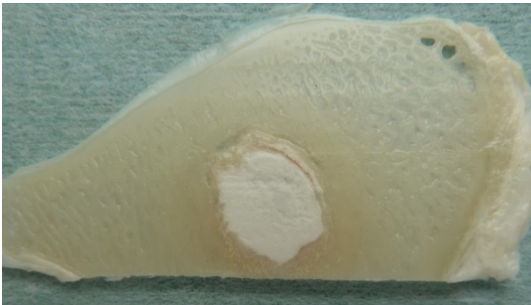


Abbildung 65: 3 Monate (Sf 10 li Ti)



Abbildung 66: 6 Monate (Sf 19 re Ti)



Abbildung 67: 18 Monate (Sf 9 re Ti)

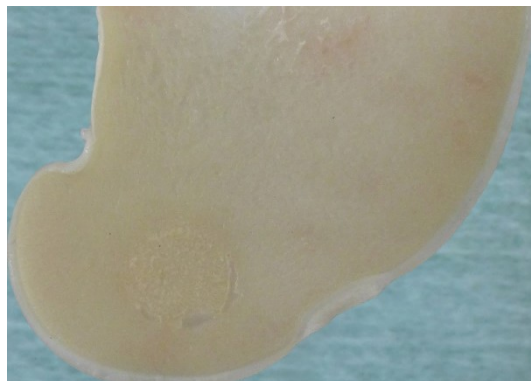


Abbildung 68: 18 Monate (Sf 23 li Fe)

3.6.5 Mikroskopische Beurteilung

An das Interface grenzt Granulationsgewebe und an dieses wiederum Knochengewebe, welches vom Lagerknochen ausgehend gebildet wird und sich in allen Standzeiten stark anfärben lässt. Dies deutet auf ein vermehrtes Knochenremodelling hin. (Abbildung 69) Ab der drei-monatigen Standzeit hat sich zusätzlich gelbes Knochenmark direkt am Interface gebildet. Weiterhin fällt bei dem Mg-CPC-Implantat auf, dass Teile des sich anschließenden neuen Knochengewebes nicht vollständig mineralisiert sind. Es handelt sich wahrscheinlich um das resorbierte Implantat-Material, welches vom Implantat weg abtransportiert wird. Am Interface wird ein Saum von mehrkernigen Makrophagen, die Vesikel mit abgebautem Implantat-Material enthalten, gebildet (Abbildung 70). Dadurch scheinen die Makrophagen einen grauen Farbton zu erhalten. Im Bereich von Gefäßen lagern die Makrophagen sich stellenweise vermehrt an (Abbildung 71).

Es finden sich auch Stellen, an denen direkt am Interface neuer Knochen gebildet wird. Dabei werden Teile des Implantats in den neu gebildeten Knochen eingemauert.

Bei einer Probe der 18-Monate-Standzeit ist der Bereich des früheren Implantats vollständig knöchern konsolidiert. Blasige Einschlüsse zeigen sich innerhalb der Knochenmatrix. Das Fettmark ist verdichtet, umgebaut und weist zahlreiche, zwischen den Fettzellen liegende, zu meist einkernige Zellen mit einem schaumigen Zytoplasma auf (Abbildung 72). Knochenfreie Hohlräume, nur mit Bindegewebe gefüllt, finden sich in mehreren Proben der 18-Monate-Standzeit.

Bei einer 18-Monats-Probe sind am Knochentrabekel, an den Stellen, an denen Knochenresorption stattgefunden hat, vereinzelte Ansammlungen von immunkompetenten Zellen zu beobachten. Vereinzelte immunkompetente Zellen finden sich auch bei je zwei Proben der ein und drei Monate Standzeit. Somit können beim Mg-CPC-Implantat, im Vergleich zu den anderen Implantaten, die meisten immunaktiven Prozesse beobachtet werden.

Mg-CPC

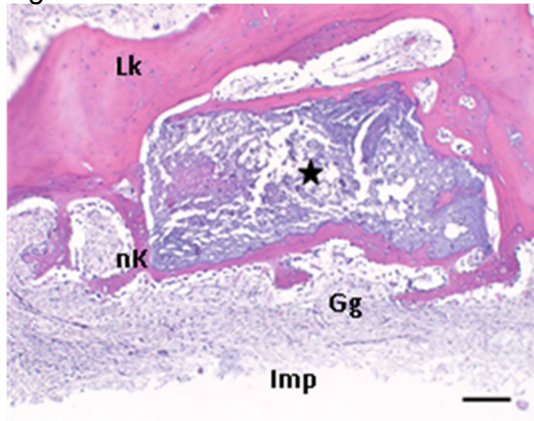


Abbildung 69: 1 Monat (Sf 8 re Fe) Maßstab 100 µm

Im Interface befindet sich eine Schicht aus Granulationsgewebe (Gg). Angrenzend an das Granulationsgewebe ist Knochengewebe (Kg) zu finden, das eine starke Blaufärbung aufweist (Stern). Hier findet vermehrt Knochenremodelling statt.

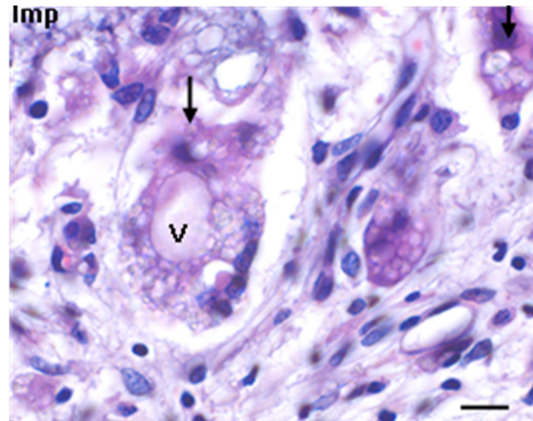


Abbildung 70: 1 Monat (Sf 20 li Ti) Maßstab 10 µm

Das Interface des Implantats (Imp) wird von mehrkernigen Makrophagen gesäumt (Pfeil). Die Makrophagen enthalten viele Vakuolen (V), die vermutlich das resorbierte Material enthalten.

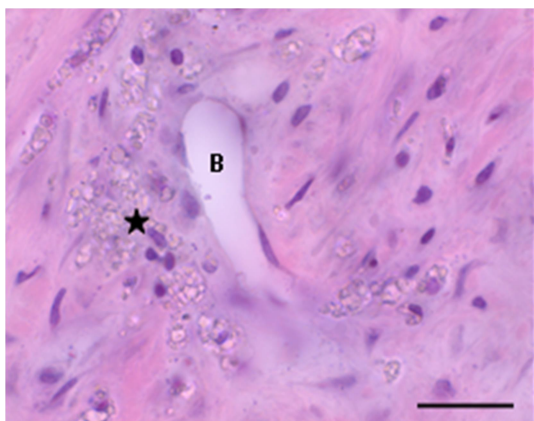


Abbildung 71: 1 Monat (Sf 20 li Ti) Maßstab 50 µm

Im Granulationsgewebe (Gg) um das Implantat (Imp) befinden sich viele Blutgefäße (B). In ihrer Nähe sind Strukturen zu finden, bei denen es sich um Abbauprodukte (Stern) des Implantats handeln könnte.

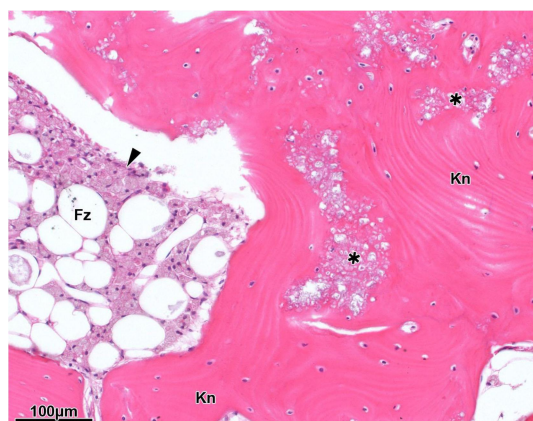


Abbildung 72: 18 Monate (Sf 23 li Fe) Maßstab 100 µm

Der Defektbereich ist bis auf einen optisch leeren zentralen Teil knöchern konsolidiert. Innerhalb der Knochenmatrix (Kn) fallen blasige Einschlüsse (Stern) auf. Das Fettmark ist fibrosiert und weist zahlreiche, zwischen den Fettzellen (Fz) liegende, zumeist einkernige Zellen mit einem schaumigen Zytoplasma auf (Pfeilspitze).

3.7 Molekularbiologie

Die molekularbiologische Untersuchung wurde gewählt, um quantitative Ergebnisse über den Knochenaufbau, die Resorption und die Zell-Zellkommunikation zu erlangen. Hierfür wurden für den Knochenaufbau Kollagen 1 α 1 und Osteocalcin als Marker gewählt. Als Marker für den Knochenabbau wurde Kathepsin-K benutzt und für die Zell-Zellkontakte Connexin-43. Alle Marker wurden in Relation zum Referenzgen/ Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin ausgewertet.

Für die Durchführung und statistische Berechnung der real-time RT-PCR konnten nicht alle aufbereiteten Proben verwendet werden. Proben, bei denen die RNA zu stark geschädigt oder verunreinigt war, wurden ausgeschlossen. Ein weiteres Ausschlusskriterium waren Strangbrüche der RNA, die zu überhöhten CT-Werten (cycle threshold-Werte) beim real-time Lauf des Referenz-Gens führten. Der CT-Wert beschreibt den Anfang einer Kurve mit exponentiellem Wachstum und ist damit eine theoretische Größe. Bei der real-time RT-PCR beschreibt der CT-Wert den Teil einer Kurve, bei dem die Fluoreszenz zuerst über den Hintergrundwert exponentiell ansteigt (Kück, 2005). Durch die Ausschlusskriterien entstanden Gruppen mit einer geringen Anzahl von Proben, weshalb diese für eine statistische Auswertung ausschieden.

Ein niedriger dCT Wert spricht für eine hohe Expression des Primers. Der dCT-Wert, ist der Quotient aus dem Mittelwert der CT-Werte einer Probe, geteilt durch den CT-Wert des Referenzgenes.

Die einzelnen Materialien wurden zu den verschiedenen Standzeiten verglichen.

Zu Beginn der Untersuchung wurden alle Primer mit Hilfe von Verdünnungsreihen und den damit entstandenen Standardkurven für die real-time RT-PCR etabliert. Bei allen Primern zeigte sich bei den Standardkurven, dass die Effizienz zwischen 1.8640 und 1.9773 lag und somit der Standardwert von 2 nicht überschritten wurde. Wie genau die einzelnen Messwerte auf der ermittelten Standardgerade liegen, gibt der Korrelationskoeffizient an, welcher möglichst bei 1 liegen sollte. Dies traf für alle verwendete Primer zu (siehe Tabelle 1).

Zusätzlich wurde für alle verwendeten Primer eine Schmelzkurve angelegt, um die Reinheit der PCR-Produkte sicherzustellen und um eine sichere Unterscheidung zwischen der Anreicherung genspezifischer Abschnitte und unspezifischer Genprodukten zu erhalten. Die Negativkontrolle zeigte bei allen Primern keine Anreicherungen. Somit konnten alle Primer als geeignet eingeschätzt werden.

3.7.1 1P-CPC

Von diesem Implantat konnten vier Proben der Drei-Monate-Standzeit, vier Proben der Sechs-Monate-Standzeit und fünf Proben der 18-Monate-Standzeit in die statistische Auswertung einbezogen werden.

Für Kollagen-1 ($p=0,472$) und Osteocalcin ($p=0,368$) konnten keine signifikanten Unterschiede der ΔCT -Werte der unterschiedlichen Standzeiten im Kruskal-Wallis Test nachgewiesen werden. (Abbildung 73) Eine deutliche Regulation der mRNA Expression lag bei Kathepsin K ($p=0,019$) und Connexin-43 ($p=0,016$) vor.

Ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney Test bei Kathepsin K zeigte sich bei der Gegenüberstellung der ΔCT -Werten von den Drei-Monats- und 18-Monats-Proben ($p=0,016$) sowie zwischen der Sechs-Monate- und der 18-Monate-Standzeit ($p=0,032$) (Abbildung 74). Demzufolge nimmt der Knochenabbau in der späten Standzeit (18-Monate) im Vergleich zur frühen Standzeit (Drei-Monate beziehungsweise Sechs-Monate) zu. Eine Regulation zwischen drei und sechs Monaten konnte nicht nachgewiesen werden ($p=0,686$). Ein Anstieg der Kathepsin K mRNA Expression wurde vor allem nach 18 Monaten postoperativ nachgewiesen.

Für Connexin-43 konnte im Mann-Whitney Test ein signifikanter Unterschied der Expression zwischen drei und 18 Monaten sowie zwischen der Sechs- und 18-Monate-Standzeit (jeweils $p=0,016$) nachgewiesen werden. Zwischen der Drei-Monate- und der Sechs-Monate-Standzeit konnte keine signifikante Veränderung gezeigt werden ($p=0,686$) (Abbildung 75). Das zeigt sich auch bei der Hochregulierung der Expression. Diese findet - wie schon bei Kathepsin K- auch bei Connexin-43 nach 18 Monaten postoperativ statt.

3.7.2 Eisenschaum ohne Zement

Vier Proben der Drei-Monate-Standzeit und vier Proben der 18-Monate-Standzeit konnten in die statistische Berechnung aufgenommen werden. Für Kathepsin K ($p=0,029$) und Osteocalcin ($p=0,029$) konnten signifikante Anstiege beim Vergleich der beiden Standzeiten beobachtet werden. Der Anstieg bei Kollagen-1 war nur tendenziell im Vergleich der beiden Standzeiten.

Keinen Unterschied im Expressionsmuster zeigte sich beim Primer für Connexin-43 ($p=0,114$).

Wie bereits beim 1P-CPC-Implantat zu sehen ist, zeigt sich ein Anstieg des Knochenabbaus zwischen der zweiten und der späteren Standzeit. Bei Eisenschaum konnte zusätzlich ein Anstieg des Knochenaufbaus festgestellt werden. Der Marker für den Zell-Zellkontakt war dagegen nicht signifikant.

3.7.3 *Eisenschaum-CPC*

Beim Vergleich der Knochenproben von Eisenschaum-CPC konnten vier Proben der Ein-Monat-Standzeit und vier Proben der Drei-Monate-Standzeit verwendet werden. Aufgrund der geringen Probenmenge (nur zwei Proben) der 18-Monate-Standzeit war es nicht möglich, signifikante Differenzen zu erhalten. Bei der Gegenüberstellung der Δ CT-Werte der einzelnen Standzeiten für Kollagen-1 ($p=0,360$) ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Kruskal-Wallis Test. Auch beim Vergleich der Δ CT-Werte von Osteocalcin ($p=0,305$), Kathepsin K ($p=0,167$) und Connexin-43 ($p=0,782$) konnten hinsichtlich der mRNA Expression keine statistischen Signifikanzen nachgewiesen werden.

3.7.4 *2P-CPC-Aspirat*

Für die statistische Berechnung konnten vier Proben der Ein-Monat-Standzeit, vier Proben der Sechs-Monate-Standzeit und fünf Proben der 18-Monate-Standzeit aufgenommen werden. Kein signifikanter Unterschied im Expressionsmuster der mRNA zeigte sich im Kruskal-Wallis Test für Kollagen-1 ($p=0,472$), Osteocalcin ($p=0,222$), Kathepsin K ($p=0,926$) und Connexin-43 ($p=0,376$), so wie bereits beim Eisenschaum-CPC Implantat festzustellen war.

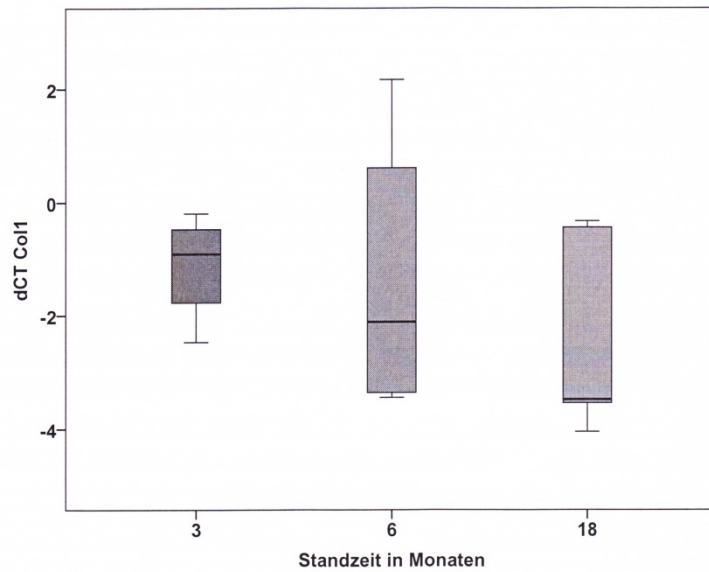


Abbildung 73: 1P-CPC: Δ CT-Werte Col1

Für Kollagen-1 (Col1) konnten keine signifikanten Unterschiede der Δ CT-Werte der unterschiedlichen Standzeiten nachgewiesen werden.

Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Der Median wird als durchgehender Strich in der Box eingezeichnet. Das untere Quartil (25%) wird durch den Beginn der Box und das obere Quartil (75%) durch das Ende der Box gekennzeichnet. Die T-Striche markieren den kleinsten (0%) und den größten Datenwert (100%) des Datensatzes.

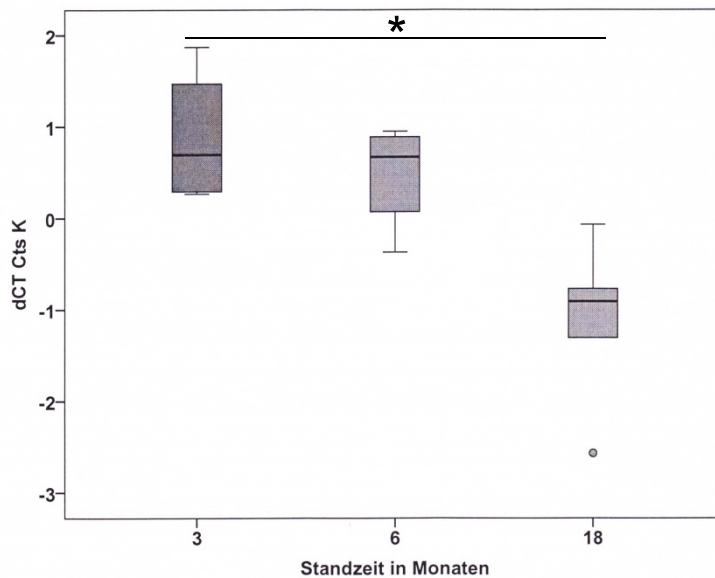


Abbildung 74: 1P-CPC: Δ CT-Werte Cts K

Signifikante Unterschiede der Δ CT-Werte von Kathepsin K (Cts K) zwischen den frühen und der späten Standzeit.

Werte außerhalb der dreifachen Standardabweichung wurden als Ausreißer gewertet und als Kreise gekennzeichnet.

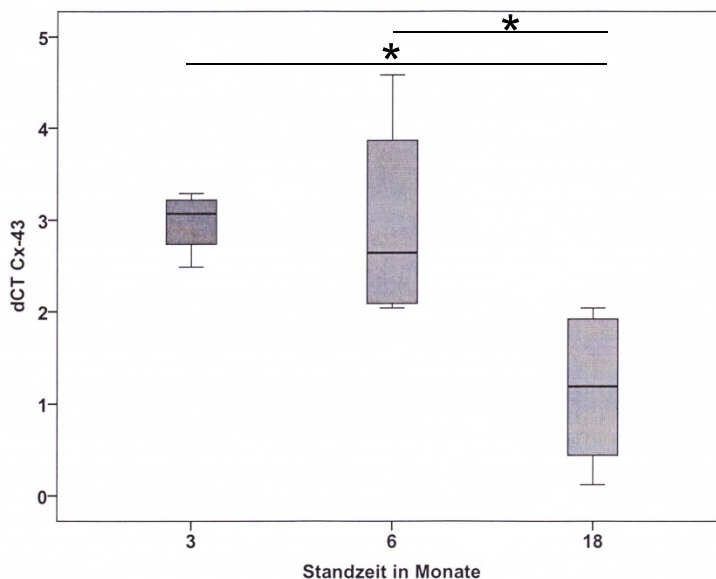


Abbildung 75: 1P-CPC: Δ CT-Werte Cx-43

Auch signifikante Unterschiede zeigten sich bei den Δ CT-Werten von Connexin 43 (Cx-43).

4 DISKUSSION

Die Indikation zur klinischen Anwendung für Knochenersatzmaterialien sind irreguläre Knochendefekte, zum Beispiel aufgrund einer Fraktur, degenerativem Knochenabbau, nach Tumor- oder Zystenentfernung oder zur Unterstützung von Osteosynthese Fixierungen (Heinemann, et al., 2013; Lode, et al., 2012).

Der Hauptnachteil bei Autotransplantaten in der Knochenwiederherstellungschirurgie ist die begrenzte Verfügbarkeit und die Entnahmemorbidität. Zum Beispiel beklagen 39% der Patienten mit Autoknochen transplantaten chronische Schmerzen an der Entnahmestelle am Beckenkamm (Arrington ED, et al., 1996). Auch die zusätzliche Operationszeit und der erhöhte Blutverlust dürfen nicht vernachlässigt werden. Andere Komplikationen, die bei der Entnahme von autologen Knochen auftreten können, sind Gefäß- und Nervenverletzungen, Infektionen, kosmetische Deformationen, Gangstörungen, Knochen- und Leistenbrüche sowie Verletzungen am Iliosakralgelenk (Unger, et al., 2009; Younger, et al., 1989). Des Weiteren ist die Menge an autologen Knochenmaterial begrenzt (Bloemers, et al., 2002).

Die Problematik bei Allograft-Implantaten beinhaltet Bakterien- und Virusübertragungen (HIV, Hepatitis), Tumorzellen-Weitergabe und Abstoßungsreaktionen im Empfängerkörper (Schnettler, et al., 2004). Eine sinnvolle Alternative bilden deshalb synthetisch hergestellte Knochenersatzmaterialien (Huber, 2006).

Die Erforschung von resorbierbaren synthetisch hergestellten Knochenersatzmaterialien ist wichtig, um die Komplikationen für den Patienten durch die Entnahme von autologen Knochenersatzmaterialien zu vermeiden.

Um das Knochenremodelling zu gewährleisten, welches das Implantat komplett knöchern erschließt und nicht nur knöchern ummauert, ist es notwendig, dass Monozyten/ Makrophagen und Blutgefäße Zugang zum Material finden. Es wird vermutet, dass der Abtransport der Knochenimplantate über den Blutweg stattfindet. Für die Bildung von neuem Knochengewebe sind Mineralien, Nährstoffe und Sauerstoff wichtig. Diese können durch Einsprossung und Neubildung von Gefäßen ebenfalls in den Implantatbereich gelangen. Angiogenese und Osteogenese sind beim Knochenumbau eng miteinander verbunden (Hu, et al., 2016). Diese These wird gestützt durch histologische Befunde, die zeigen, dass sich mehrkernige Makrophagen mit großen Vakuolen direkt an Blutgefäßen anlagern. Das Einsprossen von Blutgefäßen konnte in der hier vorliegenden Studie nur histologisch untersucht werden. Mehrkernige Makrophagen und Osteoklasten differenzieren sich aus den Monozyten/ Makrophagen und sind in der Lage, über den Cross-Talk der Knochenzellen die Migration der mesenchymalen Stammzellen und Osteoblasten-Progenitoren zu

ermöglichen. Die knöcherne Erschließung des kompletten Implantatbereiches wird durch diesen Cross-Talk ermöglicht.

Eine große Anzahl von Osteoklasten am Lagerknochen wurde nicht als positives Zeichen der Implantatresorption beurteilt, sondern vielmehr als Zeichen einer schlechten knöchernen Integration.

4.1 Methode

4.1.1 Tiermodell

In vorliegender Studie wurde als Großtiermodell das Schaf gewählt, weil bei diesem eine Gewichts-Knochenrelation zu finden ist, welche mit der des Menschen vergleichbar ist (Offer, et al., 2010). Für die Knochenersatzmaterialientestung ist es wichtig, dass bei der Beurteilung im Tiermodell möglichst ähnliche Kräftesituationen vorliegen wie später bei der Implantatverwendung im Menschen. Diese Situation hat man im Kleintiermodell nicht (Flautre, et al., 1999).

Laut Mandelkow et al. ist das Schaf aufgrund seiner Größe und Knochenstruktur besonders gut für die Erprobung von artifiziellen Knochenersatzmaterialien geeignet (Mandelkow, et al., 1990). Die Struktur des Schafsknochens ist der des menschlichen Knochens entsprechend und auch der Knochenstoffwechsel läuft annähernd mit der gleicher Geschwindigkeit ab (Rehman, et al., 1995).

Im Vergleich dazu ist bekannt, dass bei Kleintieren wie Nagern und Kaninchen eine verstärkte Knochenregeneration abläuft und damit der Vergleich zum menschlichen Knochenstoffwechsel nicht mehr gegeben ist (Flautre, et al., 1999).

Das für diese Studie gewählte Schafmodell ist somit ein Standardmodell, welches für die Beurteilung der Einheilung von Knochentransplantaten eingesetzt wird und wissenschaftlich akzeptiert ist. Dadurch lässt sich ein standardisiertes Vorgehen anwenden und auch vergleichende Beurteilungen können getroffen werden (Mandelkow, et al., 1990; Rehman, et al., 1995).

Der Defekt wurde in seiner Größe (10 mm mal 20 mm) so bemessen, dass eine postoperative Belastung während der Heilungsphase uneingeschränkt möglich ist. Gleichzeitig wurde die Defektgröße so gewählt, dass der Organismus sie nicht durchbauen kann (Schmitz, et al., 1986).

Es wurden jeweils beide Hinterbeine operiert, um eine gleichmäßige Belastung der Knochen durch das Tier zu erzeugen.

Durch Voruntersuchungen wurde beschlossen auf einen Leerdefekt zu verzichten, da bei einem Leerdefekt dieser Größe die Gefahr eines Knochenbruches stark erhöht ist. Ein Bruch des Knochens würde starke Schmerzen für das Tier bedeuten, wodurch auch die Belastung des Knochens durch eine Schonhaltung verändert wäre. Zusätzlich

war bekannt, dass Defekte dieser Größe nicht vom Körper selbstständig durchbaut werden.

Alle Defekte wurden mit demselben Diamant-Bohrer (DBCS) durchgeführt, welcher einen atraumatischen Knochendefekt setzt und Hitzenekrose durch ein integriertes Kühlsystem vermeidet (Schnettler, 1993). Auch die Defektstelle wurde immer möglichst gleich gesetzt. Die Zielstelle im Knochen wurde in Voruntersuchungen an Schafsbeinen bestimmt. Dadurch wird eine bessere Vergleichbarkeit gewährleistet.

Als Versuchstiere wurden Tiere im Alter von 3-5 Jahren gewählt. In einer Vorstudie hatte sich gezeigt, dass die Knochen bei jüngeren Tieren zu dünn für die Implantatgröße sind. Um Frakturen zu verhindern, wurden deshalb ältere Tiere gewählt.

Kritisch diskutiert werden sollte die gleichzeitige Implantation von Knochenersatzmaterialien in Femur und Tibia. Dies wurde notwendig, um die Zahl der Versuchstiere zu reduzieren.

Die Trageachse der Schafttibia ist vergleichbar mit der des Menschen und ermöglicht daher den Vergleich als Belastungsmodell (Wissing, et al., 1990).

4.1.2 Untersuchungsmethoden

Um die Resorption zu beurteilen, wurde das makroskopische Bild der Implantatränder betrachtet und die Qualität und Quantität der resorbierenden Zellen, ein- und mehrkerniger Makrophagen sowie Osteoklasten bewertet. Die mehrkernigen Makrophagen haben beim Abbau von Knochenersatzmaterial die größte Bedeutung (Offer, et al., 2010).

Bei den meisten histologischen Implantat-Auswertungen dieser Studie zeigte sich kein eindeutiger Resorptionsanstieg im Vergleich zur früheren Standzeit von 3 Monaten mit der Langzeit-Untersuchung von 18 Monaten. Dies zeigte sich auf der mRNA-Ebene anders. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg von Kathepsin K, Leitenzym der Aktivität von resorbierenden Zellen, bei den Implantaten aus 1P-CPC und Eisenschäum gezeigt werden. Es wird vermutet, dass sich nicht die Anzahl der Zellen verändert, sondern die Menge an resorbierendem Enzym in der Zelle. Histologisch sind aber nur Zellvermehrungen feststellbar. Makroskopisch wurde dagegen auch bei einigen Implantaten eine Zunahme der Resorption beobachtet.

Es konnte makroskopisch und histologisch ein Rückgang der Resorptionsaktivität beobachtet werden, sobald das Implantat oder die Implantatfragmente von einem Saum aus neu gebildetem Knochengewebe umgeben sind.

Molekularbiologische Untersuchungen konnten nicht von jeder Probe durchgeführt werden, da die Qualität der RNA vieler Proben unzureichend war. Die verminderte

Qualität der RNA ist wahrscheinlich durch die lange Zeitspanne von der Euthanasie bis zum Schockfrieren der Proben bedingt. Durch frühere Untersuchungen wird davon ausgegangen, dass gute RNA-Werte nur für einen Zeitraum von maximal 45 min postmortal gewonnen werden können. Da jedoch 4 Implantate je Tier implantiert wurden und daher 4 Knochenproben nach der Tötung explantiert und zersägt werden mussten, war die Dauer bis zum Schockfrieren sehr lange. Aus einer Knochenprobe entstanden sowohl Scheiben für die histologische als auch für die molekularbiologische Untersuchung und daher war es nicht möglich, das zeitintensive Sägen zu umgehen. Daher sollten in zukünftigen Studien die Implantatzahl pro Tier und die Aufbereitungsvorgänge pro Knochenprobe reduziert werden.

Signifikante Expressionsmuster bei der molekularbiologischen Untersuchung waren besonders zwischen den kurzen Standzeiten und der 18-Monate-Standzeit zu beobachten. Das deutet auf die Wichtigkeit von Langzeituntersuchungen nach Implantation von Ersatzmaterialien hin, dies zeigt vor allem der Marker für die Osteoklastenaktivität Kathepsin K. Das lässt schlussfolgern, dass resorbierbare Materialien, wie zum Beispiel 1P-CPC und Eisenschaum, erst 18 Monate nach der Implantation einer vermehrten Resorption unterliegen.

In der Zusammenfassung aller Ergebnisse sollte für künftige Studien darüber nachgedacht werden, die Standzeit zu verlängern und eher auf kürzere Zwischen-Standzeiten zu verzichten.

4.2 1P-CPC

Das 1P-CPC ist ein neu entwickelter ready-to-use Calcium-Phosphat-Zement und bietet damit Vorteile gegenüber Calcium-Phosphat-Zement, welcher vor Benutzung erst angemischt werden muss. So entfällt zum einen die Zeit für das Anmischen, zum anderen das Aufziehen in eine geeignete Spritze. Die Abbindereaktion des 1P-CPC beginnt erst nach Kontakt mit Flüssigkeiten, wodurch kein Verklumpen in der Spritze vor der Einbringung erfolgen kann (Heinemann, et al., 2013).

Die mineralische Zusammensetzung von Calcium-Phosphat mit Hydroxylapatit ähnelt sehr dem natürlichen Knochen (Heinemann, et al., 2013). Hydroxylapatit weist eine ähnliche Kristallstruktur wie die Knochenmatrix auf (Huber, 2006). Es ist jedoch weniger löslich im Körper als zum Beispiel TriCalcium-Phosphat, verbleibt dadurch länger im Körper und behindert damit den Knochenersatz (Ogata, et al., 2004).

Calcium-Phosphat-Zement wird im klinischen Alltag bereits verwendet, beispielsweise bei Vertikoplastiken, Frakturspaltversorgung oder in der Dentalchirurgie (Bai, et al., 1999; Komath, et al., 2004).

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Calcium-Phosphat-Zement und autologer Knochen ähnliche Ergebnisse in der mechanischen Stabilität bei klinischen und radiologischen Untersuchungen und auch bei histologischen Untersuchungen zeigten. Bei der biomechanischen Testung war der Pastenzement dem autologen Knochenersatz sogar überlegen (Bloemers, et al., 2002).

Die Druckfestigkeit der benutzten Fertigspritzen 1P-CPC ist mit dem herkömmlichen Calcium-Phosphat-Zement, welcher vor Benutzung erst noch angemischt werden muss, vergleichbar. Die Druckfestigkeit entsteht beim Fertigpastenzement jedoch schneller (Heinemann, et al., 2013).

Calcium-Phosphat-Zement ist zusätzlich wegen der Aktivierung von Osteoklasten für eine gute Resorbierbarkeit bekannt. Weiterhin besteht eine positive Wirkung auf die Neubildung von Knochen durch Calcium-Phosphat-Zement. Damit fördert Calcium-Phosphat-Zement das Gleichgewicht zwischen dem Abbau des Implantats und dem Aufbau von neuem Knochen (Schnettler, et al., 2004). Überraschend wenig mehrkernige Makrophagen fanden sich am Interface der Implantate von 1P-CPC in unserer Studie.

Der Calcium-Phosphat-Zement, welcher in dieser Studie verwendet wurde, bestand aus einer veränderten Zusammensetzung. Bei dieser Zusammensetzung war bekannt, dass eine ausgesprochen langsame Resorption im spongiösen Knochen abläuft, obwohl auch allgemein eine niedrige biologische Abbaurate für Calcium-Phosphat-Zement bekannt ist (Wu, et al., 2008).

Die Resorbierbarkeit eines Calcium-Phosphat-Zementes hängt von der Mikroporengröße, der Kristallinität und dem stoffspezifischen Sinterungsprozess ab. Eine hohe Kristallinität und kleine Mikroporen sprechen für eine geringe Resorbierbarkeit (Bloemers, et al., 2002).

Bei in vitro Untersuchungen konnten bisher für Calcium-Phosphat-Zement keine Zytotoxizität festgestellt werden. Auch konnten keine allergischen und systemischen Reaktionen im Tierversuch nachgewiesen werden (Heinemann, et al., 2013). In der vorliegenden Studie haben wir ebenfalls keine Entzündungsreaktion im Bereich des Implantats feststellen können. Der verwendete 1P-CPC zeigt eine sehr gute Verträglichkeit im Knochengewebe.

Eine anfänglich zufriedenstellende Fragmentierung und Resorption wurde beim Calcium-Phosphat-Zement beobachtet. Ähnliche Beobachtungen hatten bereits Lode et al. gemacht. Sie konnten nachweisen, dass bei in vitro Untersuchungen mit Calcium-Phosphat-Zement zunächst humane, mesenchymale Stammzellen entstanden und diese sich anschließend zu Osteoblasten differenzierten. Die Osteoblasten wuchsen direkt auf dem Calcium-Phosphat-Zement (Lode, et al., 2012). Der Anstieg der

Resorption stagnierte nach einer Standzeit von 6 Monaten zunächst und nur vereinzelt kam es zu einem erneuten Anstieg der Resorption bei der 18-Monate-Gruppe. Auch bei anderen Untersuchungen konnte eine langsame Resorption von Calcium-Phosphat-Zement beobachtet werden, sogar im Kleinterversuch (Wu, et al., 2008).

Bei der Resorption konnten Gewebestraßen durch das 1P-CPC Implantat beobachtet werden. Diese Gewebestraßen scheinen makroskopisch am Randbereich auch mit Knochentrabekeln gefüllt zu sein und im Inneren des Implantats mit lockerem Bindegewebe. Gesäumt werden die Gewebestraßen von mehrkernigen Makrophagen. Bloemers et al. beschreiben ebenfalls große mehrkernige Zellen, welche den Calcium-Phosphat-Zement abzubauen scheinen (Bloemers, et al., 2002).

Die Resorption von 1P-CPC schwankt sehr innerhalb der Standzeiten. Es kommt zu einem Knick in der Resorptionskurve bei 6 Monaten. Das ist so nicht in anderen Veröffentlichungen beschrieben.

Granulationsgewebe, welches das Implantat umgibt, ist typisch für Calcium-Phosphat-Zement (Offer, et al., 2010). Interessanterweise findet sich Granulationsgewebe in der vorliegenden Studie aber überwiegend nur bei Komposit-Implantaten mit Calcium-Phosphat-Zement. Bei beiden porösen Eisenfestkörpern, dem 2P-CPC-Aspirat-Implantat und dem Mg-CPC, kann Granulationsgewebe um das Implantat beobachtet werden. Beim alleinigen Calcium-Phosphat-Zement aber nicht. Die Ursache hierfür ist unklar.

In allen Standzeiten war auch die knöcherne Integration relativ gut, eventuell sogar in frühen Standzeiten zu hoch für ein resorbierbares Material. Ein kompletter Knochensaum umschließt das 1P-CPC-Implantat in späteren Standzeiten und lässt dadurch keinen Kontakt des Granulationsgewebes zum Implantat zu. Dies ist aber wichtig für die Resorption und Durchbauung des Implantats, weil es resorbierende Zellen, Osteoblasten-Vorläufer und Blutgefäße enthält. Es lässt sich deshalb ein Zusammenhang zwischen der knöchernen Integration und der Resorption vermuten. Je stärker die knöcherne Integration ausgebildet ist, desto geringer findet eine Resorption am Implantat statt. Es kann auch eine geringere Fragmentierung beobachtet werden, wenn die knöcherne Integration höher ist.

4.3 Eisenschaum ohne Zement

Seit Ende des 18. Jahrhunderts wird Eisen als Biomaterial in der Medizin verwendet, zunächst bei Schrauben und Drähten, um Knochenbrüche zu beheben. Durch die Korrosionsanfälligkeit bestimmter Metalle, wie zum Beispiel Magnesium und Eisen, eignen diese sich gut als abbaubare Implantate. In verschiedenen Studien konnte

keine lokale oder systemische Toxizität von Eisen nachgewiesen werden (Moravej, et al., 2011).

Eisenhaltige Implantate werden aktuell ebenfalls in anderen medizinischen Bereichen am Tier getestet und zeigen dort gute Ergebnisse, wie zum Beispiel im kardiovaskulären Bereich bei Koronarstents (Peuster, et al., 2001).

Die mechanische Eigenschaft von einem Eisenschaum wird durch seine Porengröße beeinflusst (Wen, et al., 2013). Von Natur aus weist Eisen eine hohe mechanische Stabilität auf. Des Weiteren ist Eisen ein wichtiger Bestandteil des Körpers. Viele Enzyme, zum Beispiel in der DNA-Synthese, benötigen Eisen und seine Abbauprodukte (Peuster, et al., 2001; Wen, et al., 2013).

Bioresorbierbare Eisenstents wurden für den Bereich der Kardiologie bereits getestet. Dabei konnte keine systemische Toxizität von Eisen in der Untersuchung von Organen von Tieren mit abbaubaren Eisenstents festgestellt werden (Peuster, et al., 2001). Auch eine Arbeitsgruppe aus München, welche an ähnlichen Eisenimplantaten geforscht hat, konnte keine Eisenablagerungen in den inneren Organen feststellen (Zeus, 2017).

Die Menge an reinem Eisen, welches mit einem einzigen Eisenkoronarstent implantiert wird, entspricht der monatlichen oralen Einnahme von Eisen. Es ist weniger als die Menge an Eisen, welches mit einer Blutkonserve (200-300 mg) transfundiert wird, und weniger als die empfohlene tägliche Dosis von intravenösem Eisen-Dextran (500 mg) (Waksman, et al., 2008).

Der biologische Abbau von Eisen beinhaltet die Oxidation von Eisen in Eisen(II) und Eisen(III). Andere Untersuchungen zeigten, dass keine lokale Toxizität von Eisen(II) und Eisen(III) im biologischen Gewebe beobachtet werden kann. (Wen, et al., 2013)

Die Vermutung, dass die interkonnektierenden Poren des Eisenschaum-Implantats das Einwachsverhalten von Granulationsgewebe mit ein- und mehrkernigen Makrophagen, Blutgefäßen und Osteoblasten-Vorläuferzellen fördern, konnte in der vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden. Lode et al. beobachteten ebenfalls diese Vorgänge durch interkonnektierende Poren (Lode, et al., 2012). Eine überraschend hohe Anzahl von mehrkernigen Makrophagen wurde am Eisenschaum-Implantat festgestellt.

In einer Studie von Wazen et al. konnte gezeigt werden, dass bei der Implantation von Titanschaum in Ratten nach 2 Wochen die Implantate zu 97,7 % mit neu gebildetem Knochengewebe gefüllt waren und dass die Kontaktfläche für das umliegende Knochengewebe bei Implantaten mit Poren 11-mal größer war als bei starren Titanimplantaten (Wazen, et al., 2010). In unserer Studie waren nach 18 Monaten nur 70% der Implantatporen gefüllt.

Durch eine hohe Menge an Poren im Implantat und durch Verbindungen zwischen den Poren wird es den Zellen erleichtert, ins Implantat vorzudringen, wodurch die Heilung positiv begünstigt wird. Die Anzahl der Poren und ihre Größe muss so gewählt werden, dass die Stabilität nicht beeinträchtigt wird (Bandyopadhyay, et al., 2009). Größere Poren scheinen die Angiogenese zu fördern (Cheng, et al., 2016). Durch dieses Einwachsverhalten kann eine längerfristige und stabile Verankerung zwischen Implantat und Knochen entstehen (Bandyopadhyay, et al., 2009). Eine solche stabile Verankerung war bei den 6-Monats-Proben zu erkennen. Bei diesen Proben waren stellenweise die Randporen des Implantats bereits mit Knochen gefüllt. In einigen Präparaten fand sich auch schon Osteoid in den Poren. Osteoid ist ein Produkt, welches bei der Knochenentstehung durch Osteoblasten gebildet wird (Ducy, et al., 2000).

Nicht nur die Poren, sondern auch die Hydroxylapatit-Beschichtung scheint das Einwachsverhalten beim Eisenschaum gefördert zu haben.

Xie et al. haben bereits gezeigt, dass sich eine Hydroxylapatit-Beschichtung im Vergleich zu Kunststoffoberflächen positiv auf die Aktivierung von Osteoblasten durch eine Stimulation der Genexpression auswirkt (Xie, et al., 2004).

Eine Hochregulation der mRNA Expression für Osteocalcin, einem Kennmarker von Osteoblasten, konnte im Vergleich zwischen der 3- und 18-Monate-Standzeit gezeigt werden. Weiterhin konnte molekularbiologisch ein signifikanter Anstieg der Connexin-43 und der Kathepsin-K-Expression nachgewiesen werden. Dies spricht für stattgefundenen Umbauprozesse am Implantat sowie für die Aktivierung und Umwandlung von Vorläuferzellen durch Informationsaustausch innerhalb der Zellverbände.

In unserer Studie war die Korrosion beim Eisenschaum bei allen Standzeiten gleich. Bowen et al. konnten zeigen, dass Eisen lokal korrodiert und an den Stellen der Korrosion dann große Mengen der Abbauprodukte zu finden sind, welche braunschwarz verfärbt sind. Diese Abbauprodukte sind Eisenoxide. Magnesium dagegen korrodiert gleichmäßiger und entwickelt ein weißes Korrosionsprodukt (Bowen, et al., 2012).

Ein rostbraunes Oxidationsprodukt, welches offensichtlich von den umliegenden zellulären Elementen aufgenommen wird, findet sich am Eisengerüst des Implantats. Das Material kann anscheinend nicht von Phagozyten oder Lysosomen in seiner Ursprungsform abgebaut werden. Aber auch primär nicht phagozytierende Zellen wie Osteozyten zeigen eine deutliche rostbraune Verfärbung ihres Zytoplasmas bis hin zu ihren Zellausläufern. Ultrastrukturell lässt sich ein elektronendichtes Material in größeren und kleineren intrazellulären Einschlüssen nachweisen. Extrazellulär bzw. im

Osteoid und im mineralisierten Knochen finden sich auch sehr kleine Ablagerungen, diese liegen im 2-3-stelligem Nanometerbereich. Einen Randsaum aus braunen, teils körnigen Strukturen um die Implantate, beschreibt auch Zeus in seiner Arbeit mit Eisenschäumimplantaten. Dort wurden diese Substanzen ebenfalls als Degenerationsprodukte vom Eisenschäum gewertet (Zeus, 2017).

Peuster et al. haben bei Eisenstent-Implantation in Blutgefäße ebenfalls grob-körnige bräunliche Ablagerungen im Bereich der Intima festgestellt (Peuster, et al., 2001). Auch Waksman et al. sahen bräunliche Verfärbungen im Bereich der Gefäßwand, in dem die Eisenstent-Implantation stattgefunden hatte (Waksman, et al., 2008).

Kraus et al. untersuchten das in vivo Abbauverhalten von reinem Eisen und zwei Fe-basierten Legierungen in wachsenden Ratten. Dabei wurden keine Anzeichen einer lokalen Toxizität oder sonstige abnorme klinische Beobachtungen bemerkt (Kraus, et al., 2014). Es ist jedoch bekannt, dass bei der Eisenkorrosion zytotoxische Stoffe entstehen können (Papanikolaou, et al., 2005).

Auch nach 18 Monaten Standzeit war das Eisenschäumimplantat noch fast vollständig erhalten. Lediglich am Randbereich hatte eine Resorption des Implantats stattgefunden. Zu denselben Ergebnissen kamen auch Wegener et al. und Zeus, die in ihren jeweiligen Studien jedoch nur eine Standzeit von 12 Monaten untersuchten (Wegener, et al., 2012), (Zeus, 2017). In der Kardiologie dagegen zeigte Peuster et al., dass ein Eisenstent nach der Implantation in die absteigende Aorta von weißen neuseeländischen Kaninchen innerhalb von 6-18 Monaten vollständig resorbiert wurde (Peuster, et al., 2001).

Weitere Untersuchungen zur Abklärung des biologischen Effekts des Eisenoxidaionsproduktes und der verschleppten rostbraunen Anfärbung sind nötig, bevor das Eisenschäum-Implantat am Menschen verwendet werden kann. Auch eine Steigerungsfähigkeit der Resorption, zum Beispiel durch die Verwendung einer anderen Legierung, sollte noch untersucht werden.

Im Vergleich wird Eisen viel langsamer korrodiert als Magnesium (Bowen, et al., 2012).

4.4 Eisenschäum-CPC

Eisen ist ein geeignetes Material für Implantate, da es eine hohe Festigkeit, aber auch gleichzeitig eine mittlere Korrosionsrate bietet. Magnesium dagegen wird zu schnell abgebaut (Wegener, et al., 2011).

Um die mechanische Festigkeit zu erhöhen, wurde der Eisenschäum zusätzlich mit 1P-CPC gefüllt. Dieser sollte allmählich abgebaut werden und durch neuen Knochen ersetzt werden. Zuletzt sollte der Eisenschäum noch vom Körper abgebaut werden.

Somit sollte das Implantat nach und nach seine Steifigkeit verlieren, aber gleichzeitig eine dauerhafte Stabilität bilden, um Implantatversagen, wie zum Beispiel Implantatbrüche, zu verhindern (Glorius, et al., 2011).

Überraschend wenig mehrkernige Makrophagen fanden sich am Interface des Eisenschaum-CPC-Implantats, genauso wie beim 1P-CPC. Hingegen wurde eine hohe Anzahl von mehrkernigen Makrophagen am 2P-CPC-Aspirat gefunden.

Durch die Befüllung des Hydroxylapatit-beschichteten Eisenschaums mit Calcium-Phosphat-Zement kommt es zu einer massiven Reduktion der Resorption. Granulationsgewebe kann nicht an das Implantat heranreichen, weil dieses durch einen Knochensaum in späteren Standzeiten komplett eingeschlossen wird. Der Knochensaum um das Implantat herum war stabiler als bei den anderen Implantaten. Zu Beginn war ein dichter Saum aus Granulationsgewebe um das Implantat beobachtet worden, welches mit Knochentrabekeln durchzogen war. Es gelangten keine Makrophagen, Osteoblasten-Vorläuferzellen oder Blutgefäße an das Implantat heran, um es abzubauen.

Beim Eisenschaum mit Calcium-Phosphat-Zement-Füllung scheint die Hydroxylapatit - Beschichtung keinen positiven Effekt auf den Knochenstoffwechsel zu haben, wahrscheinlich, weil durch die Calcium-Phosphat-Zement-Füllung kein Kontakt zwischen Knochenzellen und Hydroxylapatit-Beschichtung zustande kam.

Oxidationsprodukte wie beim Eisenschaum ohne Zement finden sich vereinzelt nur am Randbereich des Implantats. Das innere Eisengerüst wird durch die Calcium-Phosphat-Zement-Füllung vor der Oxidation geschützt. Die ursprüngliche Theorie, dass das Eisengerüst dem Defekt Stabilität verleiht, während die Zementfüllung abgebaut wird und durch neuen Knochen ersetzt wird und das Eisengerüst danach abgebaut wird, konnte damit nicht bestätigt werden (Glorius, et al., 2011).

Einzelne Eisenschaum-Implantate wurden bei der Einbringung aufgrund der Größe oberflächlich beschädigt. Dies stellt einen Nachteil von Festkörpern dar. Das vollständige Eisenschaum-Implantat wurde jedoch nicht zerbrochen, trotz gewaltsamer Einbringung.

4.5 2P-CPC-Aspirat

Bereits Heinemann et al. haben gezeigt, dass ein Fertigpasten-Calcium-Phosphat-Zement zusätzlich noch mit flüssigen Stoffen mischbar ist (Heinemann, et al., 2013). Auch Vorndran et al. verwendeten einen Fertizement und mischten diesen bei der Einbringung in den Defekt zusätzlich mit einer antibiotikahaltigen Flüssigkeit. Dabei

konnten sie zeigen, dass trotzdem eine Druckfestigkeit, eine schnelle Abbindereaktion und eine gute Injizierbarkeit gegeben sind (Vorndran, et al., 2013).

In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls der bekannte Pastenzement (1P-CPC) während der Einbringung ins Bohrloch mit Blut vermischt. Dadurch sollten die positiven Eigenschaften des 1P-CPC, wie z.B. die Osteokonduktivität, weiter unterstützt werden (Vater, et al., 2010). Es ist bekannt, dass die Kombination von Calcium-Phosphat-Zement mit bioaktiven Molekülen die Knochenregeneration verbessert (Perez, et al., 2013).

Die Resorption verlief, ausgehend vom Lagerknochen, in kreisförmigen Bewegungen von der Materialaußenseite nach innen. Das beobachtete auch Schüttrumpf bei Versuchen mit Calcium-Phosphat-Granulaten, welche mit Thrombozytenkonzentraten versetzt wurden (Schüttrumpf, 2010). Im Unterschied dazu zeigten sich bei unserer Studie in den späteren Standzeiten zusätzlich Granulationsstraßen im 2P-CPC-Aspirat Implantat.

Alle Proben werden von einem hellen, weichen Gewebe umgeben, das mit Knochengewebe durchzogen ist. Diese Mischung aus hellem Gewebe und Knochengewebe ist auch bei den Proben des Eisenschaum-CPC-Implantats zu beobachten. Insgesamt ist dieses Gewebe weniger stark vertreten als beim Eisenschaum. Dieses helle, weiche Gewebe nimmt im Laufe der Standzeiten um das Implantat herum ab.

Betrachtet man die Implantate untereinander, ist Folgendes festzustellen: In Bezug auf die Fragmentierung war diese beim 2P-CPC-Aspirat am weitesten fortgeschritten, wobei sie unter den Erwartungen für ein resorbierbares Material lag. Die Zerlegung des Implantats in kleine Fragmente ist ein wichtiger Schritt für einen guten Erfolg der Resorption. Eine große Anzahl von mehrkernigen Makrophagen wurde am 2P-CPC-Aspirat gefunden. Es gab jedoch einen hohen Schwankungsbereich zwischen den einzelnen 2P-CPC-Aspirat Implantaten. Es wurden auch 2P-CPC-Aspirat Implantate mit geringer Aktivität von mehrkernigen Makrophagen gefunden.

Bei der Verwendung von 2P-CPC-Aspirat konnten die besten Ergebnisse dieser Studie erzielt werden. Im Vergleich zu den anderen Materialien ist beim 2P-CPC-Aspirat das meiste Gewebe in das Implantat eingewachsen. Bei diesem einwachsenden Gewebe handelt es sich in den frühen Standzeiten um Granulationsgewebe mit Blutgefäßen, Osteoblasten-Vorläuferzellen und mehrkernige Makrophagen, die das Implantat resorbieren. Ein großer Teil des in das Implantat eingewachsenen Gewebes war bei der 18-Monate-Standzeit bereits in Knochengewebe umgewandelt worden.

Schnetter et al. konnten bereits zeigen, dass die Resorption und die Knochenbildung von einem normalen Hydroxylapatit-Implantat gesteigert werden kann; durch den

Zusatz von Wachstumsfaktoren und in dem speziellen Fall von BMP-2 (Schnettler, et al., 2009).

Die beste knöcherne Integration wurde auch nach Einbringen des 2P-CPC-Aspirat beobachtet. Jedoch traten auch hierbei erhebliche Schwankungen zwischen den einzelnen 2P-CPC-Aspirat Implantaten auf. Ursache hierfür können unterschiedliche Zahlen von mesenchymalen Stammzellen im Blut bei der Anmischung des Implantats sein und/oder auch unterschiedliche Dichte und Festigkeiten unter den Implantaten. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass bei den anfänglichen 2P-CPC-Aspirat Implantaten, die im Projekt verwendet wurden, eine zu flüssige Konsistenz der Implantate vorlag, wie in den Operationsberichten aufgeführt ist.

Primär war in vorliegender Studie auch angedacht, Blut aus dem Bohrloch zu aspirieren. In diesem Blut wäre vermutlich ein höherer Gehalt an mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zu peripherem Blut zu finden. Damit wäre die knöcherne Integration positiv verstärkt worden. Jedoch konnte aus den Bohrlöchern nicht viel Blut aspiriert werden. Wahrscheinlich kam es trotz Kühlung des Bohrers mit Natriumchlorid-Lösung während des Bohrvorganges zur leichten Wärmeentwicklung und damit zu einer Verödung der kleinen Blutgefäße im Knochen. Deshalb wurde bei den späteren Proben nur peripheres Blut, welches aus der Ohrvene gewonnen wurde, verwendet. Bei der Auswertung wurde nicht unterschieden, woher das Blut stammte. Dies wurde leider nicht ausführlich genug intraoperativ dokumentiert. Bei zukünftigen Studien sollte darauf ein höherer Stellenwert gelegt werden.

Für die Schwankungsbreiten innerhalb der 2P-CPC-Aspirat-Proben kann natürlich auch die individuelle Konstitution der Tiere verantwortlich sein. Hierbei können auch genomische Unterschiede zum Tragen kommen. Diese Varianz zwischen den Proben wird ebenfalls als Ursache für die fehlenden Unterschiede in der mRNA-Expression gewertet.

Für eine weiterführende Beurteilung ist es erforderlich, die Varianzen drastisch zu reduzieren. Dazu zählt aus unserer Sicht der einheitliche Einsatz von hochangereicherten mesenchymalen Stammzellen, die im Vorfeld in vitro kultiviert und angereichert werden. Weiterhin sollte die alleinige Implantation von 2P-CPC-Aspirat in ein Tier untersucht werden, um Immunreaktionen durch ein anderes Implantat zu vermeiden. Der damit verbundene Aufwand erscheint sinnvoll vor dem Hintergrund, dass es sich beim 2P-CPC-Aspirat um ein erfolgsversprechendes Material handelt.

4.6 Mg-CPC

Magnesium liegt zu 0,5-1% gespeichert im Knochen vor. Somit stellt der Knochen ein Reservoir für 50% des Anteils an Magnesium im Körper dar (Grünewald, et al., 2016).

Magnesium ist ein wichtiger Bestandteil des Körpers (Charyeva, et al., 2014). Mit der täglichen Aufnahme von 350 mg Magnesium pro Tag zählt es zu den essentiellen Mineralien (Erbel, et al., 2007). Es spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und bei der Funktion der Zellen. In der Abwesenheit von extrazellulärem Magnesium können Zellen nicht proliferieren. Magnesium verbessert somit die Zellreaktion. Unter anderem scheint das auf Osteoblasten zuzutreffen. Des Weiteren scheint Magnesium auch die Osteokonduktivität zu erhöhen und damit die Knochenheilung zu fördern (Han, et al., 2016; Lee, et al., 2016). Ein weiterer Vorteil von Magnesium ist seine antibakterielle Wirkung (Lock, et al., 2012).

Die größte Anzahl von resorbierenden Zellen war am Mg-CPC Implantat nachzuweisen. Dies entsprach unseren Erwartungen, da durch die höhere Löslichkeit des Magnesium-Ammoniumphosphats eine erhöhte Resorbierbarkeit von Mg-CPC im Vergleich zu Calcium-Phosphat-Zement erzielt werden kann (unveröffentlichte Vorstudie).

Andere in-vitro Untersuchungen mit Magnesiumimplantaten deuten darauf hin, dass die Magnesium-Ionen durch die Aktivierung von Osteoblasten den biologischen Abbau fördern. Auch bei in-vivo Studien konnte gezeigt werden, dass durch Magnesium das Knochenremodelling angeregt wird und die Angiogenese gefördert wird (Cheng, et al., 2016).

Ein Großteil der resorbierenden Zellen am Mg-CPC-Implantat lag als einkernige Makrophagen vor. Diese hatten bereits die Resorption beendet und befanden sich im umliegenden Gewebe, häufig in der Nähe von Gefäßen. Das lässt vermuten, dass sie über das Gefäßsystem abtransportiert werden oder ihre Stoffwechselprodukte abgeben.

Magnesium ist bekannt für seine gute Biokompatibilität sowie für eine schnelle Resorption als Magnesium-Implantat. Magnesium wird schneller abgebaut als Eisen (Wen, et al., 2013). Es ist somit abbaubar im Körper. Virtanen zeigte in seiner Studie, dass die Abbauprodukte von Magnesium nicht toxisch sind (Virtanen, 2011).

Magnesium als Stentmaterial wird seit 2004 bereits in der Kardiologie eingesetzt. Dort hat man festgestellt, dass nach vier Monaten die Stentstreben bereits vollständig vom Körper aufgelöst werden (Erbel, et al., 2007).

Durch seine relativ schnelle Abbaurate verlieren Magnesium-Implantate ihre mechanische Stabilität und sollten deshalb mit anderen Stoffen verbunden werden, um den Vorgang des Abbaus zu verlangsamen (Moravej, et al., 2011). Auch in der

uretralen Stentversorgung wird aufgrund der guten Resorptionseigenschaften mit abbaubaren Magnesiumstents geforscht (Lock, et al., 2012).

Bei Untersuchungen mit Schrauben aus Magnesium konnten keine Fremdkörperreaktion, Osteolyse oder systemische Entzündungsreaktionen nachgewiesen werden. Auch allergische Reaktionen konnten bei den Patienten nach Magnesiumschraubenimplantation nicht festgestellt werden. (Windhagen, et al., 2013)

Bei in vitro Untersuchungen mit Mg-CPC wurden ebenfalls keine zelltoxischen Reaktionen oder Entzündungszeichen festgestellt (Wu, et al., 2008).

In unseren Untersuchungen waren jedoch am Mg-CPC die meisten immunkompetenten Zellen zu finden. Fremdkörper-Riesenzellen wurden in der Untersuchung mikroskopisch von Cheng et al. festgestellt. Jedoch zeigten sich dort keine weiteren Entzündungszeichen (Cheng, et al., 2016).

Serre et al. fanden heraus, dass ein erhöhter Magnesiumgehalt im Knochen eine verringerte Osteoblastenaktivität begünstigt und sogar eine toxische Wirkung zeigt (Serre, et al., 1998). Cabrejos-Azama et al. konnten dagegen zeigen, dass im Vergleich zwischen reinem Calcium-Phosphat-Zement und Mg-CPC Mg-CPC die Knochenneubildung mehr fördert. Die Magnesium-Ionen scheinen die Osteoblasten zu aktivieren (Cabrejos-Azama, et al., 2014). In unserer Studie sahen wir ebenfalls ein erhöhtes Knochenremodelling beim Mg-CPC im Vergleich zum 1P-CPC.

Aufgrund seiner Zusammensetzung war auch eine höhere Resorbierbarkeit von Mg-CPC zu erwarten. Diese zeigte sich demzufolge in allen vier Standzeiten. Bei der 18-Monate-Standzeit waren große Teile des Mg-CPC-Implantats resorbiert. Ähnliche Ergebnisse zur schnellen Resorption von Mg-CPC fanden Cabrejos-Azama et al. (Cabrejos-Azama, et al., 2014).

Das Implantat scheint von außen nach innen abgebaut zu werden. Makroskopisch sieht es so aus, als ob das Mg-CPC-Implantat für die Resorption nicht fragmentiert wird, sondern kreisrund von außen nach innen umgewandelt wird.

Die knöcherne Erschließung erfolgte jedoch nicht im gleichen Maße wie die Resorption bei den 18-Monats-Proben. Dies war in den Untersuchungen von Wu et al. anders. Dort konnte gezeigt werden, dass der verwendete Mg-CPC abgebaut wurde und in gleicher Geschwindigkeit neuer Knochen gebildet wurde (Wu, et al., 2008). Der Unterschied zwischen beiden Studien ist das Versuchstier. Wu et al. verwendeten Kaninchen. In vorliegender Studie jedoch war das Schaf als Versuchstier gewählt worden. Wie bereits oben ausführlich beschrieben, ist für Nager ein erhöhter Knochenstoffwechsel bekannt. Somit lassen sich die Ergebnisse, bei denen das Schaf als Versuchstier gewählt wurde, eher auf den Menschen übertragen.

Im Bereich des resorbierten Materials wurde bei der Standzeit von 18 Monaten Granulationsgewebe, gelbes Knochenmark und/oder Bindegewebe vorgefunden. Dieses Füllgewebe konnte das Knochengewebe in Bezug auf die mechanische Stabilität jedoch auf keinen Fall ersetzen. Durch zu schnelle Resorption besteht hier die Gefahr von Knochenbrüchen im Bereich des eingebrachten Knochenersatzmaterials aufgrund von verzögerter Knochenneubildung im Bereich des abgebauten Mg-CPC-Implantats. In den früheren Standzeiten war ein gleichmäßiger Auf- und Abbau zu sehen.

Gegen die Verwendung des Mg-CPC in seinem jetzigen Mischverhältnis als Osteosynthesematerial spricht, dass sich bei der Resorption des Mg-CPC's Abbauprodukte davon in den Makrophagen anzureichern scheinen und dort einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben könnten. Blasige/schaumige Veränderungen im neu gebildeten Knochengewebe im Bereich des Mg-CPC Implantats zeigten sich bei den 3-, 6- und 18-Monaten-Standzeiten. Diese Veränderungen wurden nur in Knochenproben nachgewiesen, in die Mg-CPC implantiert wurde. Deshalb ist davon auszugehen, dass diese Modifikation des Knochengewebes im Zusammenhang mit dem Implantat steht. Es lässt sich vermuten, dass diese schaumig/blasigen Veränderungen die Stabilität des Knochens herabsetzen. Es kommt zu einer Irritation des umliegenden Gewebe, wodurch die Knochenheilung verlangsamt wird (Charyeva, et al., 2015). Die Ursache der blasigen Veränderungen könnte im Abbauprozess von Magnesium liegen.

Überschüssige Magnesium-Ionen scheinen durch den Körper über den Urin ausgeschieden zu werden. Genauere Untersuchungen zu Nebenwirkungen von überflüssigen Magnesium-Ionen sollten noch getätigt werden. Bisher wurden keine systemischen Ablagerungen in Organen gefunden (Cheng, et al., 2016).

Eine Schicht aus hellem schwammig wirkendem Gewebe wurde bei allen Standzeiten um das Implantat herum beobachtet. Im Vergleich zu Eisenschaum und Eisenschaum-CPC hat sich mehr von diesem Gewebe angesammelt. Im Unterschied zu den anderen Implantat-Typen scheint dieses helle weiche Gewebe mit Mg-CPC-Implantat-Teilen durchmischt zu sein. Es sieht nicht homogen hell gefärbt aus, wie es bei Eisenschaum zu beobachten war, sondern weist hellere Streifen auf. Somit war auch die knöcherne Integration in den frühen Standzeiten nur leicht vorangeschritten.

Insgesamt ist die knöcherne Durchbauung beim Mg-CPC am höchsten. Über die mechanische Stabilität ist in unserer Untersuchung kein ausreichendes Ergebnis erzielt worden, weil die Stabilität nicht gesondert betrachtet wurde.

5 AUSBLICK

Es hat sich gezeigt, dass 1P-CPC und 2P-CPC-Aspirat in seiner neuartigen Darreichungsform für die klinische Anwendung geeignet ist, genauso wie die konventionell bekannten Calcium-Phosphat-Zemente, welche nicht als Fertigpaste vorliegen. In weiterführenden Studien sollte jetzt die genaue klinische Anwendung für Fertigpasten-Zement getestet werden. Die Verwendung des 1P-CPC bei minimalinvasiven Verfahren wäre eine Möglichkeit. Auch die gezielte Einbringung von kleinen Mengen an Zement ist mit einer Fertigpaste vorstellbar.

Seit Anfang 2015 ist der 1P-CPC für die klinische Anwendung in Europa verfügbar unter dem Namen INNOTERE Paste CPC.

Des Weiteren wird der 1P-CPC in 3D-Drucksystemen eingesetzt, um individuelle Implantate herzustellen.

Der Zwei-Phasen-Mischer, welcher für 2P-CPC-Aspirat verwendet wird, ist jetzt auch auf dem Markt erhältlich, jedoch in abgewandelter Form, und zwar mit Kochsalz und 1P-CPC als Mischkomponenten. Weitere Überlegungen könnten sein, Wachstumsfaktoren mit 1P-CPC zu integrieren. Dadurch könnten gegebenenfalls bei der Resorption noch bessere Ergebnisse erzielt werden.

Die Fragestellung hinsichtlich der porösen Eisenfestkörper zielte darauf ab, ein Implantat zu haben, welches gut in den Knochen integriert wird und langsam durch den Körper in körpereigenes Material umgewandelt wird. Dadurch soll eine hohe Stabilität des Implantats erreicht werden. Es hat sich in unserer Untersuchung gezeigt, dass die knöcherne Integration des Eisenschaumkörpers ohne Füllung in der späten Standzeit gegeben war. Ein weiterer Denkansatz wäre nun eine veränderte Beschichtung des Eisenfestkörpers, um damit die knöcherne Integration noch weiter zu steigern.

Es wäre zu überlegen, ob in weiterführenden Studien Eisenschaum mit 2P-CPC-Aspirat zu füllen ist, da bereits in dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, dass die Resorption bei 2P-CPC-Aspirat höher ist. Dadurch könnte möglicherweise eine frühere Fragmentierung erreicht werden und damit dann auch eine bessere knöcherne Verankerung des Eisenschaumes mit Zementfüllung erreicht werden. Es hat sich in unserer Untersuchung gezeigt, dass die knöcherne Integration bei den Eisenschaum-Implantaten mit Zementfüllung von Anfang an sehr hoch war und dadurch die Fragmentierung gestört wurde.

Vor der weiteren Verwendung von Mg-CPC sollten zunächst noch weitere Untersuchungen über die Bioverträglichkeit von Mg-CPC durchgeführt werden, da beim Mg-CPC Implantat die größte Entzündungsreaktion beobachtet wurde. In Anlehnung an den bereits im klinischen Alltag verwendeten 1P-CPC könnte auch an der Herstellung eines Fertigpaste-Zementes aus Magnesium geforscht werden.

Wu et al. zeigten, dass je höher der Anteil von Magnesium im Mg-CPC ist, desto höher ist auch die Abbaurate (Wu, et al., 2008). Zukünftige Überlegungen könnten dort ansetzen und das Gemisch aus Magnesiumphosphat und Calcium-Phosphat in Richtung Calcium-Phosphat verändern.

Der Beobachtungszeitraum sollte in zukünftigen Studien verlängert werden und dafür auf die kurzen Standzeiten eher verzichtet werden.

Weitere Versuchsaufbauten sollten nur mit ein bis zwei Implantaten pro Tier stattfinden, um die systemische Reaktion des Körpers besser beurteilen zu können. Interessant wären dann auch Blut-, Lymphknoten- und Organuntersuchungen bezüglich der Abbauprodukte, vor allem bei den Eisenschaumkörpern und dem Mg-CPC. Dafür wäre aber ein Kleintiermodell auch denkbar.

In zukünftigen Studien sollte die Implantat-Einbringung unter Durchleuchtung erfolgen, um den Sitz des Implantats zu verbessern.

Weiterhin wäre es interessant zu klären, ob es einen Zusammenhang zwischen der Resorption und der Lage des Implantats zum Gelenk gibt und ob der biomechanische Effekt Einfluss auf die Resorption hat.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Nicht nur Frakturen allein stellen ein Problem in der Chirurgie dar, sondern auch zusätzlich auftretende Knochendefekte, welche operativ mitversorgt werden müssen. Neue Knochenersatzmaterialien werden benötigt, welche die Frakturen und Knochendefekte therapieren bzw. die Einheilung von starren Implantaten fördern (Rueger, 1995).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, fünf neu entwickelte Stoffe nebeneinander auf ihr Bioremodelling, die Resorbierbarkeit, Stabilität und Verträglichkeit zu testen. Hierzu wurden histologische und molekularbiologische Verfahren verwendet. Als Versuchsaufbau wurde ein Großtiermodell, das Schaf, gewählt, um eine Vergleichbarkeit der Belastung auf den Knochen zu erzielen, welche der des Menschen möglichst nahe kommt (Wissing, et al., 1990). Die 20 Tiere wurden auf vier Zeiträume (1, 3, 6 und 18 Monate) aufgeteilt. Bei den verwendeten Stoffen handelte es sich um einen gebrauchsfertigen Calcium-Phosphat-Zement (1P-CPC), einen Calcium-Phosphat-Zement, welcher vor der Einbringung mit Blut vom Tier durchmischt wurde (2P-CPC-Aspirat). Des Weiteren wurde ein Magnesiumzement (Mg-CPC) verwendet. Und zum anderen wurde ein neuartiger Stoff verwendet, ein Eisenschaumfestkörper. Dieser wurde zum einen mit dem Calcium-Phosphat-Zement gefüllt und zum anderen ohne Füllung belassen.

Makroskopische-, histologische und molekularbiologische Untersuchungen wurden durchgeführt.

In unserer Studie fanden sich überraschend wenig mehrkernige Makrophagen am Interface der Implantate von 1P-CPC. Bei der Resorption konnten Gewebestraßen durch das 1P-CPC Implantat beobachtet werden. Der Anstieg der Resorption stagnierte nach einer Standzeit von 6 Monaten zunächst beim 1P-CPC und nur vereinzelt kam es zu einem erneuten Anstieg der Resorption bei der 18-Monats-Gruppe. Dies wurde auch in der molekularbiologischen Untersuchung bei der Gegenüberstellung der Δ CT-Werten von den Drei-Monats- und 18-Monats-Proben bei Kathepsin K (Marker für den Knochenabbau) ($p=0,016$) sowie zwischen der Sechs-Monats- und der 18-Monats-Standzeit ($p=0,032$) gezeigt.

Die Vermutung, dass die interkonnektierenden Poren des Eisenschaum-Implantats das Einwachsverhalten von Granulationsgewebe mit ein- und mehrkernigen Makrophagen, Blutgefäßen und Osteoblasten-Vorläuferzellen fördern, konnte in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden. Eine überraschend hohe Anzahl von mehrkernigen Makrophagen wurde am Eisenschaum-Implantat beobachtet. Nicht nur die Poren, sondern auch die Hydroxylapatit-Beschichtung scheint das Einwachsverhalten beim Eisenschaum gefördert zu haben.

Ein rostbraunes Oxidationsprodukt fand sich am Eisengerüst des Implantats. Auch nach 18 Monaten Standzeit war das Eisenschaumimplantat noch fast vollständig erhalten.

Überraschend wenig mehrkernige Makrophagen fanden sich am Interface des Eisenschaum-CPC-Implantats. Hingegen wurde eine hohe Anzahl von mehrkernigen Makrophagen am 2P-CPC-Aspirat gefunden. Die Resorption beim 2P-CPC-Aspirat verlief, ausgehend vom Lagerknochen, in kreisförmige Bewegungen von der Materialaußenseite nach innen. In Bezug auf die Fragmentierung war diese beim 2P-CPC-Aspirat am weitesten fortgeschritten.

Die größte Anzahl von resorbierenden Zellen war am Mg-CPC Implantat nachzuweisen sowie ein erhöhtes Knochenremodelling beim Mg-CPC im Vergleich zum 1P-CPC. Die knöcherne Erschließung des Mg-CPC Implantats erfolgte jedoch nicht im gleichen Maße wie die Resorption in der späten Standzeit. In den früheren Standzeiten war ein gleichmäßiger Auf- und Abbau zu sehen. Insgesamt ist die knöcherne Durchbauung beim Mg-CPC am höchsten. In unseren Untersuchungen waren jedoch am Mg-CPC die meisten immunkompetenten Zellen zu finden.

Je stärker die knöcherne Integration ausgebildet ist, desto geringer findet eine Resorption am Implantat statt. Es kann auch eine geringere Fragmentierung beobachtet werden, wenn die knöcherne Integration höher ist.

7 SUMMERY

Not just major fractures represent a problem in surgery, but also the affiliated osseous bi-defects, which have to be treated or corrected, too. New substitute bone materials have not only been implemented in the therapy of fractures and associated bone defects, but also in the healing process of fixed implants (Rueger, 1995).

The aim of this thesis is to demonstrate how five newly generated materials have been incorporated into the body, with special attention being given to their bioremodelling, their rate of resorption, stability and compatability into a biologic entity. For this, histologic and molecular biologic procedures have been tested in the sheep model. Sheep were chosen as an allogenic large animal model, due to their - in relation to humans - comparable stress- and load-bearing capacity on the bone's anatomy (Wissing, et al., 1990).

The test animals were placed in four experimental groups, each being observed over a 1, 3, 6 and 18 months period, respectively. Among the material components tested were ready-to-use Calcium-Phosphate-Cement (1P-CPC), Calcium-Phosphate-Cement mixed with animal blood before application (2P-CPC-Aspirate) and a Magnesium-based Cement (Mg-CPC). As a real novelty, an iron-based foam component, of which one test series was performed with the addition of Calcium-Phosphate-Cement, and another - latter - group being left bare (i.e. without Calcium-Phosphate-filling), were introduced.

On these, macroscopic, histologic and molecular biologic studies were performed.

In our study, remarkably few polynucleic Macrophages were found on the Interface/Surfaces of the implants being treated with 1P-CPC. During the resorption process of the 1P-CPC-Implants, epithelium bridges were found throughout the implants. After a six month period, the rate of resorption stagnated firstly in the 1P-CPC-group, only to be resumed in a few cases again after 18 months. This could be demonstrated too in molecular biologic specimen for Cathepsin K (a marker for bone resorption) when the Δ CT-values in the 3-month- ($p=0,016$) and the 18month-trial-periods (where $p=0,032$) were evaluated, respectively.

It was hypothesized that the interconnecting porous microstructure of the iron-based foam implant would alleviate the growth of blood vessel along with enhanced granulation tissue (containing uni- and polynucleic macrophages) and osteoblastic precursor cells. This proofed to be the case, where a surprising high number of polynucleic macrophages were found. Therefore it could be assumed that the pores and the hydroxylapatit coating of the iron-based foam promote the growth of tissue.

On closer inspection a rusty brown oxidation product was found on the ferrous structure of the implant. Even after 18 months, the implant still remained fully intact.

Surprisingly few polynucleic macrophages were found on the Interface of the ferrous Foam-CPC-Implant. However a high count of polynucleic macrophages was extracted from the 2P-CPC-Aspirate. Resorption from the 2P-CPC-Aspirate followed (radiating from the core bone) in orbital motion from the outside of the material inwards. With regard to the fragmentation observed, this has progressed furthest in the 2P-CPC-Aspirate.

The highest count of cells resorbed was found to be in the Mg-CPC-implant, along with the highest degree of bone remodelling (when compared to the 1P-CPC). Whereas in the beginning of the series, the level of bone assembly and degradation was almost in sync, the level of osseus development did not keep pace with the simultaneous resorption observed at a later stage. Overall the level of bone tissue re-arrangement was found to be highest in the Mg-CPC. Our findings also revealed that the highest number of immunocompetent cells were found in the Mg-CPC.

To sum up, the higher the degree of bone integration was found to be (in the sheep model), the less the implant was resorbed. There was found to be a lesser degree of fragmentation, too, if the osseus integration was higher.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1P-CPC	Pasten-Calcium-Phosphat-Zement
2P-CPC-Aspirat	Zwei-Pasten-Calcium-Phosphat-Zement-Aspirat
BMP	bone morphogenetic protein
Col1	Kollagen 1
CSF-1	Macrophage colony stimulating factor
Cts K	Kathepsin K
Cx43	Connexin 43
dest	destilliertes
Eisenschaum-CPC	Eisenschaum mit Calcium-Phosphat-Zement
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fe	Femur
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
i.m.	intramuskulär
IGF-I, -II	Insulinlike growth factor-I und -II
IL	Interleukine
l	Liter
li	links
M	Molar
Mg-CPC	Magnesium-Calcium-Phosphatzement
ml	Milliliter
N	Normalität (Äquivalentkonzentration)
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natrium-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
OPG	Osteoprotegerin
PDGF	Plättchenwachstumsfaktor
PFA	Paraformaldehydlösung
PTH	Parathormon
re	rechts
RT	Reverse Transkriptase
RT-Mix	Reverse Transkriptase Mastermix
Real-time RT-PCR	Real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde

s.c.	subcutan
Sf	Schaf
TGF- β	Transforming growth factor- β
Ti	Tibia
TNF- α	Tumornekrosefaktor
VEGF	vascular endothelial growth factor

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zusammensetzung des Knochens modifiziert nach (Felsenberg, 2001) ..	4
Abbildung 2: Osteoklast mit ruffled border modifiziert nach (Soysa, et al., 2016).....	8
Abbildung 3: Pasten-CPC.....	20
Abbildung 4: Eisenschaum ohne Zement	20
Abbildung 5: Eisenschaum-CPC	20
Abbildung 6: Magnesium-CPC	20
Abbildung 7: 2P-CPC-Aspirat	20
Abbildung 8: Bohren des Loches mit manueller Kühlung.....	23
Abbildung 9: Abmessen Bohrlochtiefe	23
Abbildung 10: Bohrloch	23
Abbildung 11: Knochenzylinder	23
Abbildung 12: Einfüllen von Mg-CPC.....	23
Abbildung 13: gefülltes Bohrloch mit Zement.....	23
Abbildung 14: Bohrloch gefüllt mit Eisenschaum	24
Abbildung 15: Bohrloch gefüllt mit Eisenschaum-CPC	24
Abbildung 16: Bohrloch gefüllt mit 2P-CPC-Aspirat	24
Abbildung 17: Aufweiten des Bohrlochs	24
Abbildung 18: Beschädigung des Implantates Eisenschaum bei der Einbringung	24
Abbildung 19: Verschluss des Weichgewebes	24
Abbildung 20: Ultra-Turrax	27
Abbildung 21: RNA Überstand.....	27
Abbildung 22: 2.RNA Ethanol-gemisch.....	27
Abbildung 23: Pellet	27
Abbildung 24: Standardgerade der β 2-Mikroglobulin Primer.....	30
Abbildung 25: Schmelzkurve von β 2-Mikroglobulin.....	30
Abbildung 26: 1 Monat (Sf 11 li Ti) 1P-CPC.....	39
Abbildung 27: 3 Monate (Sf 13 re Fe) 1P-CPC.....	39
Abbildung 28: 6 Monate (Sf 7 re Fe) 1P-CPC.....	39
Abbildung 29: 6 Monate (Sf 19 li Fe) 1P-CPC	39
Abbildung 30: 18 Monate (Sf 9 li Fe) 1P-CPC	39
Abbildung 32: 1 Monat (Sf11 li Ti) Maßstab 100 μ m 1P-CPC	41
Abbildung 32: 1 Monat (Sf11 li Ti) Maßstab 50 μ m 1P-CPC	41
Abbildung 34: 3 Monate (Sf 13 re Fe) Maßstab: 100 μ m 1P-CPC	41
Abbildung 34: 3 Monate (Sf 13 re Fe) Maßstab 50 μ m 1P-CPC	41
Abbildung 35: 18 Monate (Sf 6 li Fe) Maßstab 100 μ m 1P-CPC.....	41
Abbildung 36: 1 Monat (Sf 11 re Fe) Eisenschaum ohne Zement.....	44

Abbildung 37: 3 Monate (Sf 21 re Fe) Eisenschaum ohne Zement.....	44
Abbildung 38: 6 Monat (Sf 19 li Ti) Eisenschaum ohne Zement.....	44
Abbildung 39: 18 Monate (Sf 23 li Ti) Eisenschaum ohne Zement.....	44
Abbildung 40: 1 Monat (Sf 8 li Fe) Maßstab 10 µm Eisenschaum ohne Zement.....	46
Abbildung 41: 3 Monate (Sf 13 re Ti) Maßstab 10 µm Eisenschaum ohne Zement	46
Abbildung 42: 1 Monat (Sf 11 re Fe) Maßstab 100 µm Eisenschaum ohne Zement ...	46
Abbildung 43: 1 Monat (Sf 11 re Fe) Maßstab 50 µm Eisenschaum ohne Zement	46
Abbildung 44: 18 Monate (Sf 23 li Ti) Maßstab 1 mm Eisenschaum ohne Zement	46
Abbildung 45: 1 Monat (Sf 11 li Fe) Eisenschaum-CPC.....	49
Abbildung 46: 3 Monate (Sf 21 li Fe) Eisenschaum-CPC.....	49
Abbildung 47: 6 Monate (Sf 5 re Fe) Eisenschaum-CPC	49
Abbildung 48: 18 Monate (Sf 6 li Ti) Eisenschaum-CPC	49
Abbildung 49: 18 Monate (Sf 15 re Fe) Eisenschaum-CPC	49
Abbildung 50: 1 Monat (Sf 17 re Ti) Maßstab 10 µm Eisenschaum-CPC.....	51
Abbildung 51: 1 Monat (Sf 8 re Ti) Maßstab 10 µm Eisenschaum-CPC.....	51
Abbildung 52: 1 Monat (Sf 20 re Fe) Maßstab 50 µm Eisenschaum-CPC	51
Abbildung 53: 3 Monate (Sf 12 re Ti) Maßstab 50 µm Eisenschaum-CPC.....	51
Abbildung 54: 18 Monate (Sf 6 li Ti) Maßstab 200 µm Eisenschaum-CPC	51
Abbildung 55: 1 Monat (Sf 20 li Fe) 2P-CPC-Aspirat	54
Abbildung 56: 3 Monate (Sf 10 li Fe) 2P-CPC-Aspirat	54
Abbildung 57: 6 Monate (Sf 5 li Fe) 2P-CPC-Aspirat	54
Abbildung 58: 18 Monate (Sf 24 re Fe) 2P-CPC-Aspirat.....	54
Abbildung 59: 18 Monate (Sf 15 li Fe) 2P-CPC-Aspirat	54
Abbildung 60: 1 Monat (Sf 20 li Fe) Maßstab 1 cm 2P-CPC-Aspirat.....	56
Abbildung 61: 3 Monate (Sf 10 li Fe) Maßstab 10 µm 2P-CPC-Aspirat.....	56
Abbildung 62: 18 Monate (Sf 24 re Fe) Maßstab 200 µm 2P-CPC-Aspirat	56
Abbildung 63: 1 Monat (Sf 17 re Fe) Mg-CPC	59
Abbildung 64: 3 Monate (Sf 13 li Fe) Mg-CPC.....	59
Abbildung 65: 3 Monate (Sf 10 li Ti) Mg-CPC	59
Abbildung 66: 6 Monate (Sf 19 re Ti) Mg-CPC	59
Abbildung 67: 18 Monate (Sf 9 re Ti) Mg-CPC	59
Abbildung 68: 18 Monate (Sf 23 li Fe) Mg-CPC.....	59
Abbildung 69: 1 Monat (Sf 8 re Fe) Maßstab 100 µm Mg-CPC.....	61
Abbildung 70: 1 Monat (Sf 20 li Ti) Maßstab 10 µm Mg-CPC	61
Abbildung 71: 1 Monat (Sf 20 li Ti) Maßstab 50 µm Mg-CPC	61
Abbildung 72: 18 Monate (Sf 23 li Fe) Maßstab 100 µm Mg-CPC	61
Abbildung 73: 1P-CPC: ΔCT-Werte Col1.....	65

Abbildung 74: 1P-CPC: Δ CT-Werte Cts K	65
Abbildung 75: 1P-CPC: Δ CT-Werte Cx-43	65

10 LITERATURVERZEICHNIS

Abdelgawad, M. E., Delaisse, J.-M., Hinge, M., Jensen, P. R., Alnaimi, R. W., Rolighed, L., et al. (2016). Early reversal cells in adult human bone remodeling: osteoblastic. *Histochem Cell Biol*, 145(6): 603-615.

Anderson, J. (1988). Inflammatory response to implants. *ASAIO Trans*, 34: 101-107.

Arrington ED, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., & Bucknell, A. L. (1996). Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthoped*, 329:300-309.

Aumüller, G., Aust , G., Doll , A., Engele, J., Kirsch, J., Mense , S., et al. (2006). *Anatomie (Duale Reihe)*. Stuttgart: Thieme.

Bai, B., Jazrawi, L., Kummer, F., & Spivak, J. (1999). The use of an injectable, biodegradable calcium phosphate bone substitute for the prophylactic augmentation of osteoporotic vertebrae and the management of vertebral compression fractures. *Spine (Phila PA 1976)*, 24: 1521–6.

Bandyopadhyay, A., Espana, F., Balla, V., Bose, S., Ohgami, Y., & Davies, N. (2009). Influence of porosity on mechanical properties and in vivo response of Ti6Al4V implants. *Acta Biomaterialia*, 1640–1648.

Benninghoff, A., & Drenckhahn, D. (2008). *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie* (17. Ausg., Bd. 1). München/Jena: Urban und Fischer, Elsevier.

Bloemers, F., Blokhuis, T. J., Patka, P., Bakker, F. C., Wipperfmann, B. W., & Haarman, H. J. (2002). Autologous bone versus calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res Part*, 66B: 526–531.

Bose, D., Eggebrecht, H., Haude, M., Schmermund, A., Erbel, R. (2006). First absorbable metal stent implantation in human coronary arteries. *Am Heart Hosp J*, 4:128-130.

Bowen, P., Gelbaugh, J., Mercier, P., Goldman, J., & Drelich, J. (2012). Tensile testing as a novel method for quantitatively evaluating bioabsorbable material degradation. *Wiley Online Library: J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 100B: 2101–2113.

Cabrejos-Azama, J., Alkhraisat, M., Rueda, C., Torres, J., Blanco, L., & López-Cabarcos, E. (2014). Magnesium substitution in brushite cements for enhanced bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 403–410.

Carpenter, T., Moltz, K., Ellis, B., Andreoli, M., McCarthy, T., Centrella, M., et al. (1998). Osteocalcin Production in Primary Osteoblast Cultures Derived from Normal and Hyp Mice. *Endocrinology*, 139: 35–43.

Chapurlat, R. (2016). Cathepsin K inhibitors and anti sclerostin antibodies. The next treatments for osteoporosis? *Joint Bone Spine*, 4310: 1-3.

Charles, J., & Aliprantis, A. (2014). Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 449-459.

Charyeva, O., Thormann, U., Lips, K., Heimann, L., Sommer, U., Szalay, G., et al. (2015). Histological Comparison of New Biodegradable Magnesium-Based Implants for Maxillofacial Applications. 14(3):637–645.

Charyeva, O., Thormann, U., Schmidt, S., Sommer, U., Lips, K., & Schnettler, R. (2014). In vivo comparison of new biodegradable magnesium-based implants for orthopaedic uses. 14(3): 637–645.

Cheng, M.-q., Wahafu, T., Jiang, G.-f., Liu, W., Qiao, Y.-q., Peng, X.-c., et al. (2016). A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration. *Scientific Reports*, 1-14.

Clarke, D. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Am Soc Nephrol*, 3: 131–139.

Diaz, A., Willis, A., & Sim, R. (2000). Expression of the proteinase specialized in bone resorption, cathepsin K, in granulomatous inflammation. *Mol. Med*, 6: 645-659.

Ducy, P., Schinke, T., & Karsenty, G. (2000). Raven Press: a sophisticated fibroblast unter central surveillance. *Science*, 5484: 1501–1504.

Einhorn, T. A. (2003). Bone Graft Substitutes - Symposium. *Basic Science of Bone Graft Substitutes*.

Ellinghaus, A., Schmidt-Bleek, K., Duda, G., & Schell, H. (2011). The physiology of fracture healing – a histological outline. *Osteologie*, 20: 11–16.

Erbel, R., Böse, D., Haude, M., Kordish, I., Churzidze, S., Malyar, N., et al. (2007). Absorbierbare Stents. *Herz*, 32: 308-19.

Eriksen, E., Axelrod, D., & Melsen, F. (1994). *Bone Histomorphometry*. Raven Press.

Felsenberg, D. (2001). Struktur und Funktion des Knochens. *Pharmazie in unserer Zeit*, 6: 488-494.

Flautre, B., Delecourt, C., Blary, M. C., van Landuyt, P., Lemaître, J., & Hardouin, P. (1999). Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone*, 25 (2 Suppl): 35-39.

Francis, A., Yang, Y., Virtanen, S., & Boccaccini, A. (2015). Iron and iron-based alloys for temporary cardiovascular applications. *J Mater Sci*, 26:138.

Geiger, M., Li, R., & Friess, W. (2003). Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Advanced Drug Delivery*, 55: 1613– 1629.

Glorius, S., Nies, B., Farack, J., Quadbeck, P., Hauser, R., Standke, G., et al. (2011). Metal Foam – Bone Cement Composites: Mechanical and Biological Properties and Perspectives for Bone Implant Design. *Advanced engineering materials*, 13(11): 1019-1023.

Großardt, C., Ewald, A., Grover, L. M., Barralet, J. E., & Gbureck, U. (2010). Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphat cements by osteoclastic cells. *Volume 16*(Number 12), 16(12): 3687-3695.

Grünewald, T., Rennhofer, H., Hesse, B., Burghammer, M., Stanzl-Tschegg, S., Cotte, M., et al. (2016). Magnesium from bioresorbable implants: Distribution and impact on the nano- and mineral structure of bone. *Biomaterials*, 76: 250-260.

Gu, S., Xu, H., Riquelme, M. A., Burra, S., Callaway, D., Cheng, H., et al. (2015). Connexin 43 Channels are Essential for Normal Bone Structure and Osteocyte Viability. *J Bone Miner Res*, 30(3): 550–562.

Han, J., Wan, P., Ge, Y., Fan, X., Tan, L., Li, J., et al. (2016). Tailoring the degradation and biological response of a magnesium–strontium alloy for potential bone substitute application. *Materials Science and Engineering C*, 58: 799–811.

Hannink, G., & Arts, J. (2011). Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury*, 42(2): 22-25.

Hayman, A., Macary, P., Lehner, P., & Cox, T. (2001). Tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): identification in diverse human tissues and dendritic cells. *cells. J Histochem Cytochem*, 49 (6): 675-684.

Heinemann, S., Rössler, S., Lemm, M., Ruhnow, M., & Nies, B. (2013). Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid. *Acta Biomaterialia*, 9(4): 6199-6207.

Hu, K., & Olsen, B. (2016). Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *The Journal of Clinical Investigation*, 26(2): 509–526.

Huber, F.-X. (2006). First histological observations on the incorporation of a novel. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 7: 50.

Ishikawa, K. (2003). Effects of spherical tetracalcium phosphate on injectability and basic properties of apatitic cement. *Key Eng Mater*, 240: 369–72.

Khairoun, I., Boltong, M., Driessens, F., & Planell, J. (1997). Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement. *J Biomed Mater Res*, 38: 356–60.

Kim, J., & Kim, N. (2016). Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Medical Journal*, 52: 12-17.

Komath, M., & Varma, H. K. (2004). Fully injectable calcium phosphate cement: a promise to dentistry. *Indian J Dent Res*, 15: 89–95.

Kraus, T., Moszner, F., Fischerauer, S., Fiedler, M., Martinelli, E., Eichler, J., et al. (2014). Biodegradable Fe-based alloys for use in osteosynthesis: outcome of an in vivo study after 52 weeks. *Acta Biomater*, 10: 3346–53.

Kück, U. (2005). *Praktikum der Molekulargenetik*. Berlin Heidelberg: Springer.

Lee, I., Piao, X.-H., Kim, Y., & Park, K.-D. (2016). Cell proliferating responses to magnesium coated β -TCP surface. *Oral Biology Research*, 40(1): 36-42.

Leunig, M., Hertel, R., Siebenrock, K., Ballmer, F., Mast, J., & Ganz, R. (2000). The evolution of indirect reduction techniques for the treatment of fractures. (375: 7-14).

Lock, J., Draganov, M., Whall, A., Dhillon, S., Upadhyayula, S., Vullev, V., et al. (2012). Antimicrobial Properties of Biodegradable Magnesium for Next Generation Ureteral Stent Applications. *34th Annual International Conference of the IEEE EMBS*, (S. 1378-1381). San Diego, California USA.

Lode, A., Meissner, K., Luo, Y., Sonntag, F., Glorius, S., Nies, B., et al. (2012). Fabrication of porous scaffolds by three-dimensional plotting of a pasty calcium phosphate bone cement under mild conditions. *J Tissue Eng Regen Med*, 8: 682-693.

Looker, A. C., Orwoll, E. S., & Johnston, C. (1997). Prevalence of low femoral bone density in older U.S. adults from NHANES III. *Bone Miner Res*, 12: 1761–1768.

Lumetti, S., Manfredi, E., Ferraris, S., Spriano, S., Passeri, G., Ghiacci, G., et al. (2016). The response of osteoblastic MC3T3-E1 cells to micro- and nanotextured,. *J Mater Sci*, 27: 68.

Mandelkow, H., Hallfeldt, K., Kessler, S., Gayk, M., Siebeck, M., & Schweiberer, L. (1990). Knochenneubildung nach Implantation verschiedener Hydroxylapatitkeramiken. Tierexperimentelle Studie am Bohrlochmodell der Schafstibia. *Unfallchirurg*, 93(8): 376-379.

Masaki, I., Williams, G. L., Ikeuchi, T., Sakai, K., Fukumoto, S., & Yamada, Y. (2016). Pannexin 3 and connexin 43 modulate skeletal development. *Journal of Cell Science*, 129: 1018-1030.

Moravej, M., & Mantovani, D. (2011). Biodegradable metals for cardiovascular stent application: interests and new opportunities. *J. Mol. Sci.*, 12: 4250-4270.

Neve, A., Corrado, A., & Cantatore, F. P. (2013). Osteocalcin: Skeletal and Extra-Skeletal Effects. *Journal of Cellular Physiology*, 228: 1149–1153.

Offer, L., Veigel, B., Pavlidis, T., Heiss, C., Gelinsky, M., Reinstorf, A., et al. (2011). Phosphoserine-modified calcium phosphate cements: bioresorption and substitution. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(1): 11-19.

Ogata, K., Imazato, S., Ehara, A., Ebisu, S., Kinomoto, Y., Nakano, T., et al. (2004). Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites. *Wiley InterS*, 72A: 127-135.

Owen, M. (1972). Cellular dynamics of bone. *Bourne G (ed) The biochemistry and physiology of bone*, 2: 271.

Papanikolaou, G., & Pantopoulos, K. (2005). Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(2): 199-211.

Perez, R. A., Kim, T.-H., Kim, M., Jang, J.-H., Ginebra, M.-P., & Kim, H.-W. (2013). Calcium phosphate cements loaded with basic fibroblast growth factor: Delivery and in vitro cell response. *J Biomed Mater Res Part A*, 101A: 923–931.

Peuster, M., Beerbaum, P., Bach, F.-W., & Hauser, H. (2006). Are resorbable implants about to become a reality? *Cardiol Young*, 16: 107–116.

Peuster, M., Wohlsein, P., Brüggmann, M., Ehlerding, M., Seidler, K., Fink, C., et al. (2001). A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal—results 6–18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart*, 86: 563–569.

Plotkin, L. (2011). Connexin 43 and bone: not just a gap junction. *Actual osteol*, 7(2): 79–90.

Plotkin, L., Speacht, T., & Donahue, H. (2015). Cx43 and mechanotransduction in bone. *Curr Osteoporos Rep*, 13(2): 67–72.

Rehman, I., Smith, R., Hench, L., & Bonfield, W. (1995). Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy. *J. Biomed Mater Res*, 29 (10): 1287-1294.

Riggs, B., & Melton , L. (1995). The worldwide problem of osteoporosis, Insights afforded by epidemiology. *Bone*, 17: 505–511.

Robertson, D., Pierre, L., & Chahal, R. (1976). Preliminary observations of bone ingrowth into porous materials. *J Biomed Mater Res*, 10: 335-344.

Rueger, J. (1995). Knochenersatzmittel: heutiger Stand und Ausblick. *Der Orthopäde*, 27: 72–79.

Ryan, G., Pandit, A., & Apatsidis, D. P. (2005). Fabrication methods of porous metals for use. *Biomaterials*, 27: 2651–2670.

Schendel, S., & Peuroi, J. (2009). Magnesium-Based Bone Cement and Bone Void Filler: Preliminary Experimental Studies. *Scientific foundation*, 20: 461-464.

Schmidt-Rohlfing, B., Tzioupis, C., Menzel, C. L., & Pape, H. C. (2009). Tissue Engineering von Knochengewebe, Prinzipien und klinische Anwendungsmöglichkeiten. *Unfallchirurg*, 112: 785–795.

Schmitz, J. P., & Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibular nonunion. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 205: 299-308.

Schnettler, R. (1993). *Experimentelle Untersuchungen zum Einwachsverhalten von autogenen und allogenen Spongiosatransplantaten im Vergleich zu Keramik, DBM und basischem Fibroblastenwachstumsfaktor*. Jena: Habilitationsschrift.

Schnettler, R., Knöß, P., Heiss, C., Stahl, J.-P., Meyer, C., Kilian, O., et al. (2009). Enhancement of Bone Formation in Hydroxyapatite Implants by rhBMP-2 Coating. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 90B: 75–81.

Schnettler, R., Stahl, J. P., Alt, V., Pavlidis, T., Dingeldein, E., & Wenisch, S. (2004). Calcium Phosphate-Based Bone Substitutes. *European Journal of Trauma*, 30: 219–229.

Schüttertrumpf, J. (2010). *Einfluss von autologen Platelet-Rich-Plasma auf die Osteogenese nach Implantation eines Calciumphosphat-basierenden Knochen-Ersatzmittels (Calcibon Granules)*. Gießen: VVB Lauferweiler Verlag.

Serre, C., Papillard, M., Chavassieux, P., Voegel, J., & Boivin, G. (1998). Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.*, 14(2): 97-106.

Shi, S., Kirk, M., & Kahn, A. (1996). The Role of Type I Collagen in the Regulation of the Osteoblast Phenotype. *J Bone Miner Res*, 11: 1139-1145.

Soltmann, U., Nies, B., & Böttcher, H. (2011). Cements with Embedded Living Microorganisms – A New Class of Biocatalytic Composite Materials for Application in Bioremediation, Biotechnology. *Advanced engineering materials*, 13(1-2): B26-B31.

Sommerfeldt, D. W., & Rubin, C. (2001). Biology of bone and how it orchestrates. *Eur Spine J*, 10: 86–95.

Soysa, N., & Alles, N. (2016). Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476: 115-120.

Stein, G. S., & Lian, J. B. (1993). Molecular Mechanisms Mediating Proliferation/. *The Endocrine Society*, 14: 424-442.

Sunderkötter, C., Steinbrink, M., Goebeler, R., Bhardwaj, R., & Sorg, C. (1994). Macrophages and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol*, 55: 410-422.

Tang, L., & Eaton, J. (1995). Inflammatory responses to biomaterials. *Am. J. Clin. Pathol.*, 103: 466-471.

Tay, B. K., Patel, V. V., & Bradford, D. S. (1999). Calcium sulfate- and calcium phosphate-based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone. *Orthop Clin North*, 30: 615–23.

Thormann, U., Alt, V., Heimann, L., Gasquere, C., Heiss, C., Szalay, G., et al. (2014). The Biocompatibility of Degradable Magnesium Interference Screws: An Experimental Study with Sheep. *BioMed Research International*, 2015: 1-15.

Thorwarth, M., Schultze-Mosgau, S., Kessler, P., Wiltfang, J., & Schlegel, K. A. (2005). Bone Regeneration in Osseous Defects Using a Resorbable Nanoparticulate Hydroxyapatite. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 63: 1626-1633.

Unger, R., Halstenberg, S., Günther, H., Sartoris, A., Brochhausen, C., & Kirkpatrick, C. (2009). Bewertung von neuartigen Biomaterialien zum Zweck der Knochenrekonstruktion und -regeneration. *Orthopäde*, 38: 1020-1028.

Unger, R., Halstenberg, S., Sartoris, A., Brochhausen, C., & Kirkpatrick, C. J. (2009). Bewertung von neuartigen Biomaterialien zum Zweck der Knochenrekonstruktion und -regeneration: In-vitro-Versuche mit Mono- und Kokulturen von Osteoblasten und Endothelzellen. *Orthopäde*, 38: 1020–1028.

van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G., & Langevoort, H. L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*, 46: 845–852.

Vater, C., Lode, A., Bernhardt, A., Reinstorf, A., Nies, B., & Gelinsky, M. (2010). Modifications of a calcium phosphate cement with biomolecules - influence on nanostructure, material, and biological properties. *Wiley Online Library*, 95(3): 912-923.

Virtanen, S. (2011). Biodegradable Mg and Mg alloys: Corrosion and biocompatibility. *Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials*, 176: 1600-1608.

Vorndran, E., Geffers, M., Ewald, A., Lemm, M., Nies, B., & Gbureck, U. (2013). Ready-to-use injectable calcium phosphate bone cement paste as drug carrier. *Acta Biomaterialia*, 9(12): 9558-9567.

Waksman, R., Pakala, R., Baffour, R., Seabron, R., Hellinga, D., & Tio, F. O. (2008). Short-Term Effects of Biocorrodible Iron Stents in Porcine Coronary Arteries. *Journal of Interventional Cardiology*, 21: 15-20.

Wazen, R., Lefebvre, L.-P., Baril, E., & Nanci, A. (2010). Initial evaluation of bone ingrowth into a novel porous titanium. *Wiley InterScience*, 94(1): 64-71.

Wegener, B., Sichler, A., Quadbeck, P., Milz, S., Hermanns, W., Nies, B., et al. (2012). Einwachsverhalten eines neuen eisenbasierten zellularen Knochenersatzmaterials. *DKOU2012*, (S. Grundlagenforschung). Berlin 23.-26.10.

Wegener, B., Sievers, B., Utzschneider, S., Müller, P., Jansson, V., Rößler, S., et al. (2011). Microstructure, cytotoxicity and corrosion of powder-metallurgical iron alloys. *Materials Science and Engineering B*, 176(20): 1789-1796.

Wen, Z., Zhang, L., Chen, C., Liu, Y., Wu, C., & Dai, C. (2013). A construction of novel iron-foam-based calcium phosphate/chitosan coating. *Materials Science and Engineering C*, 33(3): 1022–1031.

Windhagen, H., Radtke, K., Weizbauer, A., Diekmann, J., Noll, Y., Kreimeyer, U., et al. (2013). Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *BioMedical Engineering OnLine*, 12: 62.

Wissing, H., Stürmer, K. M., & Breidenstein, G. (1990). Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Hefte zur Unfallheilkunde*, 212: 479–488.

Wolf-Brandstetter, & et al. (2009). *Posterbeitrag ESB Conference*. Lausanne.

Wu, F., Wei, J., Guo, H., Chen, F., Hong, H., & Liu, C. (2008). Self-setting bioactive calcium–magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 4(6): 1873–1884.

Xia, L., Yin, Z., Mao, L., Wang, X., Liu, J., Jiang, X., et al. (2016). Akermanite bioceramics promote osteogenesis, angiogenesis and suppress osteoclastogenesis for osteoporotic bone regeneration. *Scientific Reports*, 6: 1-17.

Xie, J., Baumann, M., & McCabe, L. (2004). Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *Wiley InterScience*, 71(1): 108-117.

Younger, E. M., & Chapman, M. W. (1989). Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*, 3: 192-195.

Zaidi, M., & Iqbal, J. (2016). Closing the loop on the bone-resorbing osteoclast. *nature medicinetime*, 22: 460-461.

Zeus, H. M. (2017). *Erprobung eines neuen degradierbaren, metallischen Knochenersatzwerkstoffes*. München: Promotionsarbeit.

11 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Neuendorf, A., Lips, K. S., Stigler, B., Schulz, S., Nies, B., Glorius, S., Schnettler, R. (2012). Resorption und Biokompatibilität von Verbundmaterialien aus Eisen-Metallschaum und Calciumphosphatzementen - eine experimentelle Studie am Schaf. *Vortrag Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie*. 23. – 26. Oktober 2012 Berlin. GR13-1166

12 ERKLÄRUNG

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 DANKSAGUNG

Ich möchte mich beim Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen des Fachbereichs Medizin für die Möglichkeit, dort meine Doktorarbeit zu schreiben, bedanken. Mein besonderer Dank geht dabei an meine Doktormutter und Leiterin des Labors, Frau Prof. Dr. Katrin Lips. Sie hat mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich mit guten Denkanstößen immer wieder auf den richtigen Weg gebracht. Danken möchte ich auch ihrem Team für die Unterstützung, vor allem Frau Dr. med. ved. Ursula Sommer für die Unterstützung bei der mikroskopischen Auswertung sowie Frau Ivonne Berger, Frau Olga Dakischew und Frau Ida Oberst, ohne deren Hilfe ich im Labor verloren gewesen wäre.

Einen Dank auch an den jetzigen Direktor für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß und seinen Vorgänger, Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler. Ebenfalls möchte ich meiner ehemaligen Betreuerin, Frau Dr. Brigitte Stigler, danken.

Der Firma InnoTERE unter der Leitung von Herrn Dr. Nies möchte ich für die Bereitstellung der Implantate und für die Zusammenarbeit danken.

Bedanken möchte ich mich aufrichtig bei meinem Mann, der mich immer wieder motiviert hat, die Arbeit zu Ende zu bringen, und bei meiner ganzen Familie, besonders bei meinen Großeltern, die mich alle immer wieder unterstützt haben.

Einen großen Dank auch an meine Freunde für ihre Unterstützung.